

PCT

世界知的所有権機関  
国際事務局  
特許協力条約に基づいて公開された国際出願



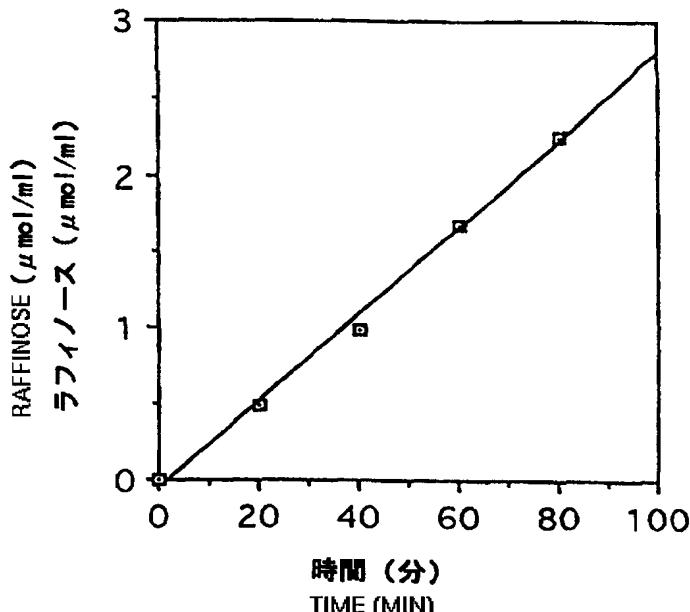
(51) 国際特許分類6 <b>C12N 9/10, 15/54, A01H 5/00 // C12N 5/10, 1/21, (C12N 9/10, C12R 1:91) (C12N 5/10, C12R 1:91) (C12N 1/21, C12R 1:01)</b>		A1	(11) 国際公開番号 <b>WO98/49273</b>
			(43) 国際公開日 1998年11月5日(05.11.98)
(21) 国際出願番号 <b>PCT/JP97/03879</b>			
(22) 国際出願日 1997年10月24日(24.10.97)			
(30) 優先権データ 特願平9/111124 1997年4月28日(28.04.97)	JP	(74) 代理人 弁理士 遠山 勉, 外(TOYAMA, Tsutomu et al.) 〒103 東京都中央区東日本橋3丁目4番10号 ヨコヤマビル6階 Tokyo, (JP)	
(60) 法律上関連する他の国内特許文献の表示 (63) 繙続による関係 US 846,234(一部継続) 出願日 1997年4月28日(28.04.97)		(81) 指定国 AU, BR, CA, CN, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書	
(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 味の素株式会社(AJINOMOTO CO., INC.)(JP/JP) 〒104 東京都中央区京橋一丁目15番1号 Tokyo, (JP)			
(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 大住千栄子(OSUMI, Chieko)(JP/JP) 野崎甚司(NOZAKI, Jinshi)(JP/JP) 木田隆夫(KIDA, Takao)(JP/JP) 〒210 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社 中央研究所内 Kanagawa, (JP)			

(54) Title: RAFFINOSE SYNTHETASE GENE, PROCESS FOR PRODUCING RAFFINOSE, AND TRANSFORMED PLANT

(54) 発明の名称 ラフィノース合成酵素遺伝子、ラフィノースの製造法及び形質転換植物

## (57) Abstract

A raffinose is produced by the action of a raffinose synthetase having the following properties on sucrose and galactinol: (1) activity and substrate specificity: raffinose is produced from sucrose and galactinol; (2) optimal pH: about 6-8; (3) optimal temp.: about 35-40 °C; (4) molecular weight: (i) molecular weight as measured by gel filtration chromatography: about 75-95 kDa; (ii) molecular weight as measured by polyacrylamide gel electrophoresis (native PAGE): about 90-100 kDa; and (iii) molecular weight as measured by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) under reducing conditions: about 90-100 kDa; (5) inhibition: it is inhibited by iodoacetamide, N-ethylmaleimide, and myoinositol.



(57)要約

下記性質を有するラフィノース合成酵素をスクロースとガラクチノールに作用させ、ラフィノースを生成させる。

(1) 作用及び基質特異性：スクロースとガラクチノールからラフィノースを生成する。

(2) 至適pH：約6～8

(3) 至適温度：約35～40℃

(4) 分子量：

①ゲルろ過クロマトグラフィーにより測定される分子量：約75kDa～95kDa

②ポリアクリルアミドゲル電気泳動（Native PAGE）により測定される分子量：約90kDa～100kDa

③還元条件下におけるSDS-PAGEにより測定される分子量：約90kDa～100kDa

(5) 阻害：

ヨードアセトアミド、N-エチルマレイミド、ミオイノシトールにより阻害される。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AM	アルメニア	FR	フランス	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
AT	オーストリア	GA	ガボン	LT	リトアニア	SN	セネガル
AU	オーストラリア	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SZ	スウェーデン
AZ	アゼルバイジャン	GD	グレナダ	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BF	ブルガリア・ファソ	GN	ギニア	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BG	ブルガリア	GW	ギニア・ビサオ	ML	マリ	TT	トリニダッド・トバゴ
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
BR	ブラジル	HR	クロアチア	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MW	マラウイ	US	米国
CA	カナダ	ID	インドネシア	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CF	中央アフリカ	IE	アイルランド	NE	ニジェール	VN	ヴィエトナム
CG	コンゴー	IL	イスラエル	NL	オランダ	YU	ユーゴースラビア
CH	スイス	IS	アイスランド	NO	ノルウェー	ZW	ジンバブエ
CI	コートジボアール	IT	イタリア	NZ	ニュージーランド		
CM	カメルーン	JP	日本	PL	ポーランド		
CN	中国	KE	ケニア	PT	ポルトガル		
CU	キューバ	KG	キルギスタン	RO	ルーマニア		
CY	キプロス	KP	北朝鮮	RU	ロシア		
CZ	チェコ	KR	韓国	SD	スードン		
DE	ドイツ	KZ	カザフスタン	SE	スウェーデン		
DK	デンマーク	LC	セントルシア	SG	シンガポール		
EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SI	スロヴェニア		
ES	スペイン	LK	スリ・ランカ				

## 明細書

## ラフィノース合成酵素遺伝子、ラフィノースの製造法及び形質転換植物

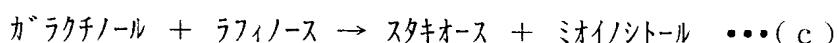
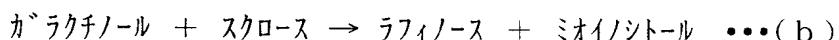
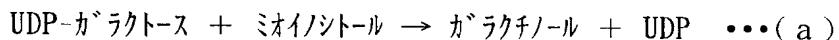
## 技術分野

本発明は、ラフィノース合成酵素、ラフィノース合成酵素もしくはラフィノース合成酵素を含む細胞抽出物を用いたラフィノースを合成する方法、ラフィノース合成酵素をコードするDNA、及びこのDNAの植物における利用に関する。ラフィノースは、ビフィズス菌増殖活性を有し食品原料として、あるいは臓器保存液などの医薬品として様々な分野で利用されている。

## 背景技術

ラフィノースは、スクロースのグルコシル基にガラクトースが $\alpha - 1$ 、6結合したラフィノース族オリゴ糖の一つである。ラフィノース属オリゴ糖には、ラフィノースの他に、ガラクトースが2つ結合したスタキオース、3つ結合したベルバースコースなどがある。これらの糖は、豆類、ナタネ、綿実など様々な植物の種子中の貯蔵糖と、キュウリやメロンなどウリ科植物にみられる転流糖として、また耐冷性を獲得したロゼット葉、甜菜（サトウダイコン）など植物に広く存在する。

ラフィノース族オリゴ糖の生合成は、次のようにあり、



各々の反応は (a) ガラクチノール合成酵素 (GS : EC2.4.1.123)、(b) ラフィノース合成酵素 (RS : EC2.4.1.82) (c) スタキオース合成酵素 (STS : EC2.4.1.67) により触媒される。

現在、ラフィノースは、甜菜から抽出され、スクロース精製過程において分離精製されている。しかし、ラフィノースはスクロースの結晶性を低下させるので、

甜菜は低ラフィノースを目標に育種、改良され、甜菜中のラフィノース含量は0.03%から0.16% (Enzyme Microb. Technol., Vol. 4 May, 130-135(1982))と低い。従って、このような低含量の甜菜より効率的にラフィノースを得るのは容易ではない。

先に述べたように、ラフィノースは、ダイズをはじめとするマメ科の成熟種子に含まれているほか、甜菜、あるいはキュウリなどのウリ科植物に含まれている。ダイズの成熟種子中には、ダイズオリゴ糖として、スクロース（含有量約5%）、スタキオース（同約4%）、ラフィノース（同約1%）が含まれている。これらのダイズオリゴ糖は、脱脂ダイズから除蛋白した画分に回収され、濃縮後、機能性食品などに利用されている。しかし、オリゴ糖全体の中でもラフィノースは10%であり、量的にも少ない。

一方、ラフィノースの酵素的合成法も報告されている (Trends in Glycoscience and Glycotechnology 7.34, 149-158(1995))。これは、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼの縮合反応によりガラクトビオースを合成し、さらにこのガラクトビオースをガラクトシル基の供与体としてスクロースにガラクトシル転移反応により転移させて、ラフィノースを合成する方法である。しかし、この反応は、乳糖加水分解物1.9kgよりガラクトビオースが350g合成され、ガラクトビオース190gとスクロース760gよりラフィノース100gが得られる反応であり、生成するラフィノースの収率が低く、効率的な合成法には至っていない。

以上のような方法の他に、生合成系酵素遺伝子の形質転換により、ラフィノース含量の高い植物を育種する方法も考えられる。例えば、Kerrらはガラクトノール合成酵素遺伝子をクローニングし、ナタネを形質転換した (WO93/02196)。しかし、その結果、GS活性は増加したが、ラフィノース族オリゴ糖は逆に低下し、ガラクトノール合成酵素を導入することによるラフィノース族オリゴ糖の生合成を増加させるという目的は達成されなかった。したがって、植物のラフィノース族オリゴ糖の含量を増加させるする方法は提供されていない。

一方、ラフィノース族オリゴ糖を低減化することも求められている。先に述べたように、ラフィノース族オリゴ糖は、主に、ダイズなど豆類、ナタネ、綿実な

ど様々な植物の種子中の貯蔵糖と、キュウリやメロンなどウリ科植物にみられる転流糖として、また、耐冷性を獲得したロゼット葉、甜菜、など植物に広く存在しており、ダイズ、ナタネ、綿実などの搾油されたミールには、これらのラフィノース族オリゴ糖が含まれている。これらミールのほとんどは、飼料として利用されているが、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼを持たないヒトや動物は、直接ラフィノース族オリゴ糖を消化することはできない。さらに、ラフィノース族オリゴ糖は、腸内細菌が資化しガスを発生させるなどにより、飼料の代謝エネルギー効率を低下させることが知られており、飼料中のラフィノース族オリゴ糖を除くことで、トリの飼料効率が上昇したと報告されている (Coon, Proceeding Soybean Utilization Alternatives. Univrsity of Minnesota, 203-211 (1989))。このようなことから、ラフィノース族オリゴ糖の減少したダイズ、ナタネ、綿実などの飼料作物が望まれている。

また、これらの植物の中では、油の含量を多くする育種がなされてきた。光合成産物は、油脂、タンパク質、ラフィノース族オリゴ糖を含む糖質に分配されている。ダイズでは、油脂量と糖質量に負の相関があることが報告されている。ラフィノース族オリゴ糖の生成を抑制することにより、同じ光合成の能力のダイズにおいて油脂含量を増加させることができることを期待できる。

以上の観点から、Kerrらは、交配選抜育種により、ラフィノース族オリゴ糖が80%から90%低下した低ラフィノース族オリゴ糖ダイズ品種を作出したと報告している (WO93/00742)。しかしこれは、品種の作出であり、栽培適性や、耐病性などに対応した様々な品種に応用できるものではない。また、広く様々な植物に適用できるものではない。

甜菜、サトウキビなどにも含まれるラフィノースは、砂糖の結晶性を低下させることが知られている。従って、ラフィノースの生成がなければ、これら植物での砂糖の生成効率が上がる事が期待できるが、ラフィノースを含まないテンサイは作出されていない。

上述したように、従来精製されたラフィノース合成酵素は、酵素活性として確認されているのみであり、酵素の同定はなされていなかった。また、その活性も

低いものであり、活性の高いラフィノース合成酵素が望まれていた。また、従来のラフィノースの製造法は収率が低く、効率のよいラフィノースの製造法が望まれていた。その一方で、ラフィノース族オリゴ糖が低減化された植物を育種することも望まれている。

### 発明の開示

本発明は、上記観点からなされたものであり、活性の高いラフィノース合成酵素及びこれをコードするDNAの取得、効率的なラフィノースの酵素的合成法、及びラフィノース合成酵素をコードするDNAの植物における利用法を提供することを課題とする。

本発明者は、上記課題を解決するために鋭意検討を行った結果、キュウリからラフィノース合成酵素を精製することに成功した。また、このラフィノース合成酵素をコードする遺伝子をクローニングするために、本発明者らは鋭意検討を行った。その結果、キュウリのラフィノース合成酵素ペプチド断片のアミノ酸配列より推定した塩基配列をもとに一本鎖DNAを化学合成し、この一本鎖合成DNAをプライマーとして、キュウリから抽出したpoly(A)<sup>+</sup>RNAより作製したcDNAを鋳型としてPCRを行い、ラフィノース合成酵素遺伝子に特異的なDNA断片を得た。さらに、このDNA断片をプローブとしてキュウリ由来cDNAライブラリーに対しハイブリダイゼーションを行い、ラフィノース合成酵素遺伝子を単離する方法を採用し、ラフィノース合成酵素遺伝子を単離した。また、キュウリ由来ラフィノース合成酵素遺伝子の情報をもとにダイズ由来ラフィノース合成酵素遺伝子をクローニングするために鋭意研究を行い、その結果、ダイズ由来ラフィノース合成酵素遺伝子を単離した。この単離したラフィノース合成酵素遺伝子断片を用い、植物で発現可能な制御領域を有するキメラ遺伝子を作成し、植物を形質転換した。さらに、導入したラフィノース合成酵素遺伝子により、ラフィノース族オリゴ糖の低減化した植物を作出するに至った。

すなわち本発明は、スクロースとガラクチノールからラフィノースを生成する活性を有するラフィノース合成酵素を提供する。

好ましくは、本発明は、下記（A）、（B）、（C）又は（D）に示すタンパク質であるラフィノース合成酵素を提供する。

- （A）配列表の配列番号5に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。
- （B）配列表の配列番号5に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、スクロースとガラクチノールからラフィノースを生成する活性を有するタンパク質。
- （C）配列表の配列番号24に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。
- （D）配列表の配列番号24に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、スクロースとガラクチノールからラフィノースを生成する活性を有するタンパク質。

また、本発明は、下記性質を有するラフィノース合成酵素を提供する。

（1）作用及び基質特異性：スクロースとガラクチノールからラフィノースを生成する。

（2）至適pH：約6～8

（3）至適温度：約35～40°C

（4）分子量：

①ゲルろ過クロマトグラフィーにより測定される分子量：約75kDa～95kDa

②ポリアクリルアミドゲル電気泳動（N a t i v e P A G E）により測定される分子量：約90kDa～100kDa

③還元条件下におけるS D S - ポリアクリルアミドゲル電気泳動（S D S - P A G E）により測定される分子量：約90kDa～100kDa

（5）阻害：

ヨードアセトアミド、N-エチルマレイミド、ミオイノシトールにより阻害される。

本発明は、上記ラフィノース合成酵素の具体的な態様として、アミノ酸配列中

に、配列表配列番号 28～30 に示す各アミノ酸配列を含むラフィノース合成酵素を提供する。

また、本発明は、下記 (C) 又は (D) に示すタンパク質であるラフィノース合成酵素を提供する。

(C) 配列表の配列番号 24 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(D) 配列表の配列番号 24 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、スクロースとガラクチノールからラフィノースを生成する活性を有するタンパク質。

本発明はまた、スクロース及びガラクチノールに上記ラフィノース合成酵素を作用させてラフィノースを生成させることを特徴とするラフィノースの製造方法を提供する。

本発明はさらに、上記ラフィノース合成酵素をコードするDNA、及び、特に、下記 (A)、(B)、(C) 又は (D) に示すタンパク質をコードするDNAを提供する。

(A) 配列表の配列番号 5 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列表の配列番号 5 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、スクロースとガラクチノールからラフィノースを生成する活性を有するタンパク質。

(C) 配列表の配列番号 24 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(D) 配列表の配列番号 24 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、スクロースとガラクチノールからラフィノースを生成する活性を有するタンパク質。

本発明は、上記DNAの具体的態様として、下記 (a)、(b)、(c) 又は (d) に示すDNAを提供する。

(a) 配列表の配列番号 4 に記載の塩基配列のうち、少なくとも塩基番号 56～

2407からなる塩基配列を含むDNA。

(b) 配列表の配列番号4に記載の塩基配列のうち、少なくとも塩基番号56～2407からなる塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつスクロースとガラクチノールからラフィノースを生成する活性を有するタンパク質をコードするDNA。

(c) 配列表の配列番号23に記載の塩基配列のうち、少なくとも塩基番号156～2405からなる塩基配列を含むDNA。

(d) 配列表の配列番号23に記載の塩基配列のうち、少なくとも塩基番号156～2405からなる塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつスクロースとガラクチノールからラフィノースを生成する活性を有するタンパク質をコードするDNA。

また、本発明は、ラフィノース合成酵素のアンチセンスRNAまたはセンスRNAを発現させるために使用できるDNA、すなわち、下記(e)又は(f)に示すDNAを提供する。

(e) 配列表の配列番号4に記載の塩基配列のうち、少なくとも塩基番号56～2407からなる塩基配列若しくはその相補的塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA。

(f) 配列表の配列番号23に記載の塩基配列のうち、少なくとも塩基番号156～2405からなる塩基配列若しくはその相補的塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA。

さらに本発明は、ラフィノース合成酵素遺伝子又はその一部と、植物細胞で発現可能な転写制御領域とを含むキメラ遺伝子、及び、このキメラ遺伝子で形質転換された植物を提供する。

また本発明は、前記キメラ遺伝子で植物を形質転換し、この遺伝子を植物細胞内で発現させることにより、前記植物のラフィノース族オリゴ糖含量を変化させる方法を提供する。

以下、上記(1)～(5)に記載の性質を有するラフィノース合成酵素、又は、上記(A)、(B)、(C)及び(D)のタンパク質であるラフィノース合成酵

素を、単に「ラフィノース合成酵素」ということがある。また、ラフィノース合成酵素をコードするDNA、又はラフィノース合成酵素をコードし、さらに非翻訳領域を含むDNAを、「ラフィノース合成酵素遺伝子」ということがある。

以下、本発明を詳細に説明する。

#### <1>本発明のラフィノース合成酵素

本発明のラフィノース合成酵素は、下記(A)、(B)、(C)又は(D)に示すタンパク質である。

- (A) 配列表の配列番号5に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。
- (B) 配列表の配列番号5に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、スクロースとガラクチノールからラフィノースを生成する活性を有するタンパク質。
- (C) 配列表の配列番号24に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。
- (D) 配列表の配列番号24に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、スクロースとガラクチノールからラフィノースを生成する活性を有するタンパク質。

本発明のラフィノース合成酵素には、下記性質を有するものが含まれる。

(1) 作用及び基質特異性：スクロースとガラクチノールからラフィノースを生成する。

(2) 至適pH：約6～8

(3) 至適温度：約35～40℃

(4) 分子量：

①ゲルろ過クロマトグラフィーにより測定される分子量：約75kDa～95kDa

②ポリアクリルアミドゲル電気泳動(Native PAGE)により測定される分子量：約90kDa～100kDa

③還元条件下におけるSDS-PAGEにより測定される分子量：約100kDa

A G E) により測定される分子量：約 90 kDa ~ 100 kDa

(5) 阻害：

ヨードアセトアミド、N-エチルマレイミド、ミオイノシトールにより阻害される。

上記の性質を有するラフィノース合成酵素は、キュウリ本葉より単離、精製されたものであり、発明者により初めて同定された。このキュウリ由来のラフィノース合成酵素は、後記実施例に示すように、その酵素タンパク質のアミノ酸配列中に、配列表配列番号 1 ~ 3、または、28 ~ 30 に示す各アミノ酸配列を含んでいる。また、その全アミノ酸配列を、配列表配列番号 5 に示す。

ラフィノース合成酵素は、ウリ科植物、例えばメロン (*Cucumis melo*)、キュウリ (*Cucumis sativus*) などの植物から得られる。特に、これらの植物の葉、特に葉脈部分、及び種子等の組織がラフィノース合成酵素の含有量が多い。

次に、本発明のラフィノース合成酵素の製造法の例として、キュウリからラフィノース合成酵素を単離・精製する方法を説明する。

播種後 6 ~ 10 週間のキュウリ本葉より、葉脈部分を集め、液体窒素下で乳鉢等を用いて磨碎し、緩衝液を加えてタンパク質を抽出する。その際、ラフィノース合成酵素の分解、失活等を防ぐための物質、例えば PMSF (フェニルメタンスルフォニルフルオリド) 等のプロテアーゼ阻害剤や、ポリクラール AT (セルバ (Serva) 社製) 等を加えてよい。この抽出液から濾過及び遠心分離により不溶物を除去し、粗抽出液を得る。

上記のようにして得られる粗抽出液を、通常のタンパク質の精製法、例えば、陰イオン交換クロマトグラフィー、ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル濾過、塩析等を組み合わせて分画することによって、ラフィノース合成酵素を精製することができる。

陰イオン交換クロマトグラフィーは、例えば、HiTrap Q (ファルマシア社製) 等の強塩基性陰イオン交換体や、DEAE-TOYOPEARL (東ソー社製) 等の弱塩基性陰イオン交換体を充填したカラムを用いることによって行うことができる。ラフィノース合成酵素を含む抽出液をこれらのカラムに通液させ

て酵素をカラムに吸着させ、カラムを洗浄した後に、高塩濃度の緩衝液を用いて酵素を溶出させる。その際、段階的に塩濃度を高めてもよく、濃度勾配をかけてもよい。例えば、H i T r a p Q カラムを用いた場合には、カラムに吸着したラフィノース合成酵素活性は、0. 3 M程度のNaClで溶出される。また、D E A E - T O Y O P E A R Lでは溶出液として0. 05 M～0. 35 MのNaCl濃度勾配が、ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーでは溶出液として0. 01 M～0. 3 Mのリン酸濃度勾配が好ましい。

上記の操作の順は特に問わず、また、各操作は2回又はそれ以上繰り返してもよい。また、それぞれのカラムに試料液を通液する前に、透析等によって試料液を適当な緩衝液に交換しておくことが望ましい。さらに、それぞれの段階で試料液を濃縮してもよい。

精製の各段階においては、分画されたフラクション中に含まれるラフィノース合成酵素活性を測定し、活性の高いフラクションを集めて次の段階に供試することが好ましい。ラフィノース合成酵素活性を測定する方法としては、例えば、Le hle, H らにより報告されている放射性同位体を用いる方法 (Eur. J. Biochem., 38, 103-110(1973)) が挙げられる。また、この変法として、反応温度と基質濃度を変更してもよい。例えば、最終濃度として、10 mM  $^{14}\text{C}$ -スクロース、20 mM ガラクチノール、25 mM HEPES (2-(4-(2-ヒドキシエチル)-1-ヒペラジニル)エタンスルホン酸) -NaOH, pH 7.0、5 mM DTT (ジチオスレイトール) を含む反応液に、10  $\mu\text{l}$  の酵素液を加えて50  $\mu\text{l}$  とする。これを、32 °C、1時間インキュベートして反応を行い、200  $\mu\text{l}$  のエタノールを加え、95 °Cで30秒間加熱して、反応を停止する。この反応液の遠心上清をワットマン3MM濾紙にスポットし、n-プロパノール：酢酸エチル：水=4：1：2にて展開した。 $^{14}\text{C}$ のラフィノースへの取り込みを調べ、これをラフィノース合成酵素活性 (n mol / 時間) とする。

本発明者は、上記の方法に代わる方法として、ラフィノース合成反応により生成するラフィノースをHPLC (高速液体クロマトグラフィー) により定量することによって、ラフィノース合成酵素活性を測定する方法を開発した。この方法

によれば、Lehle, Hらの方法に比べて簡便かつ迅速に測定することができ、特に精製操作における活性フラクションの検出には好適である。以下に本方法を説明する。

ラフィノース合成反応は、最終濃度が下記の組成になるように調製した反応液に  $10 \sim 50 \mu\text{l}$  のラフィノース合成酵素液を添加して  $100 \mu\text{l}$  とし、 $32^\circ\text{C}$  で 60 分間、反応を行う。

〔反応液組成（最終濃度）〕

2.5 mM スクロース

5 mM ガラクチノール

5 mM DTT

20 mM トリス塩酸緩衝液（pH 7.0）

上記のようにして反応を行った後、反応液の 4 倍容のエタノールを加え、 $95^\circ\text{C}$  で 30 秒間加熱して反応を停止する。これを遠心し、遠心上清を減圧乾固した後、蒸留水に溶解し、HPLC にて反応生成物中のラフィノースを定量し、ラフィノース酵素活性とする。HPLC は、例えば、糖分析システム DX 500 (CarboPac PA1カラム、パルスドアンペロメトリー検出器 (ダイオネクス社製)) を用いて行うことができる。

反応時間を変化させたときの生成ラフィノース量を上記の方法により測定した結果を図 1 に示す。図から明らかなように、本方法により、ラフィノース合成酵素活性を直線性よく、かつ簡便に測定することができる。

精製されたラフィノース合成酵素の精製度の確認や分子量の測定は、ゲル電気泳動、ゲルろ過クロマトグラフィー等によって行うことができる。また、酵素学的性質は、反応温度あるいは反応 pH を変化させて酵素活性を測定し、あるいは種々の酵素阻害剤や金属イオン等を反応液に添加し、残存酵素活性を測定することによって、検討すればよい。さらに、ラフィノース合成酵素を種々の pH 条件下又は温度条件下に一定時間さらした後に酵素活性を測定することにより、安定 pH 範囲及び安定温度範囲を調べることができる。

前記したラフィノース合成酵素の性質は、このようにして決定されたものであ

るが、測定条件によって異なる結果が得られる場合があることに留意すべきである。例えば、ゲルろ過クロマトグラフィーによる分子量の測定は、用いるゲルろ過担体や緩衝液の種類、あるいは分子量マーカーによって、影響される。また、酵素活性は、同じpHであっても緩衝液の種類又は塩濃度によって異なることが多い。したがって、ラフィノース合成酵素の同定に際しては、個々の性質のみではなく、総合的な検討を行うことが好ましい。

本発明のラフィノース合成酵素は、上記のようにキュウリから単離・精製することによって得られるが、異種タンパク質の醸酵生産に通常用いられている方法によって、後述するキュウリ由来、ダイズ由来あるいは他の植物由来のラフィノース合成酵素をコードするDNAを適当な宿主に導入し、発現させることによっても製造することができる。

ラフィノース合成酵素遺伝子を発現させるための宿主としては、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) をはじめとする種々の原核細胞、サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) をはじめとする種々の真核細胞が考えられるが、植物細胞、特にタバコ、キュウリ、シロイヌナズナ (アラビドプシス) 等の植物由来の細胞が望ましい。

形質転換に用いる組み換えプラスミドは、発現させようとする細胞の種類に応じた発現ベクターに、ラフィノース合成酵素をコードするDNAを挿入することで調製可能である。植物の発現ベクターは、植物で働くプロモーターDNA配列、またはそれらを複数個組み合わせたものと、植物で働くターミネーターDNA配列を持ち、その間に外来遺伝子を挿入できる配列を有するものであればよい。

このようなプロモーターには、植物体全体で発現するCaMV 35S RNAプロモーター、CaMV 19S RNAプロモーター、ノパリン合成酵素プロモーター等、緑色組織で発現するRubisco小サブユニットプロモーター等、種子などの部位特異的に発現するナピン (nапин)、ファセオリン (фасеолин) 等の遺伝子のプロモーター等が挙げられる。さらに、上記のようなターミネーターとしてはノパリン合成酵素ターミネーター、Rubisco小サブユニット3'側部位等が挙げられる。

植物用の発現ベクターとしてp B I 1 2 1、p 3 5 S - G F P (CLONTECH社製)等が市販されているのでこれを用いてもよい。ウイルスRNAを発現するベクターを用い、そのコードしている外皮タンパク質などの遺伝子をラフィノース合成酵素遺伝子に置換してもよい。

形質転換には通常用いられている方法、アグロバクテリウム法、パーティクルガン法、エレクトロポレーション法、PEG法等を、供試する宿主細胞に応じて用いればよい。ラフィノース合成酵素活性の検出には、ラフィノース合成酵素精製を行った方法を用いることができる。その際、試料を陰イオン交換カラムに通すなどして、あらかじめ $\alpha$ -ガラクトシダーゼを除去ておくことが望ましい。

キュウリ由来のラフィノース合成酵素をコードする遺伝子とは、発現した時にラフィノース合成酵素活性を有するものであればすべて含まれるが、好ましくは、配列表の配列番号5記載のアミノ酸配列をコードするDNAを有する遺伝子、又は配列表の配列番号4記載の塩基配列を有する遺伝子が挙げられる。また、ダイズ由来のラフィノース合成酵素をコードする遺伝子とは、発現した時にラフィノース合成酵素活性を有するものであればすべて含まれるが、好ましくは、配列表の配列番号24記載のアミノ酸配列をコードするDNAを有する遺伝子、又は配列表の配列番号23記載の塩基配列を有する遺伝子が挙げられる。尚、配列表の配列番号5又は24記載のアミノ酸配列をコードする遺伝子とは、コドンの縮重を考慮すると種々の塩基配列が含まれる。即ち、このような種々の塩基配列の中から、遺伝子発現系の諸要素、たとえば宿主細胞の種類等による優先コドン、転写されたRNAにより形成される高次構造の回避などを考慮して選択すればよい。選択された塩基配列は、自然界からクローニングされたDNAであっても、人為的に化学合成されたDNAであってもよい。

## < 2 > 本発明のラフィノース合成酵素をコードするDNA

ラフィノース合成酵素をコードするDNAは、キュウリなどの植物体から単離したpoly(A)<sup>+</sup>RNAからcDNAライブラリーを調製し、このcDNAライブラリーをハイブリダイゼーションによってスクリーニングすることによって、取得することができる。ハイブリダイゼーションに用いるプローブは、ラフ

ィノース合成酵素タンパク質の部分アミノ酸配列に基づいて合成されたオリゴヌクレオチドをプライマーとするPCR (polymerase chain reaction) によって増幅することによって、取得することができる。

以下に、キュウリ由来のpoly (A)<sup>+</sup>RNAから本発明のDNAを取得する方法を具体的に説明する。

poly (A)<sup>+</sup>RNAの抽出部位としては、ラフィノース合成酵素遺伝子が発現していればキュウリ植物体のどこを用いても良く、様々な生長段階の葉、茎、蕾、果実、種子等より得ることができるが、望ましくは果実をつけた後の展開葉、特に葉脈部分を材料とするのがよい。

キュウリ組織から全RNAを抽出するには、効率よく損傷の少ないRNAが得られるならば方法は制限されず、例えば、フェノール／SDS法、グアニジンイソチオシアネート／塩化セシウム法等、公知のいずれの方法によっても可能である。こうして得た全RNAからオリゴ(dT)担体を用いてpoly (A)<sup>+</sup>RNAを分離できる。また、全RNAを抽出せずにpoly (A)<sup>+</sup>RNAを得ることのできるキット (MPG Direct mRNA Purification Kit、CPG, INC. 社等) を使用しても良い。

cDNAライブラリーのスクリーニングに使用するプローブのDNA断片は、PCRを行うことで得ることができる。既にわかっているペプチド断片のアミノ酸配列、例えば配列表配列番号1～3に示すアミノ酸配列より推定される塩基配列を有する一本鎖DNAを化学合成し、これをプライマーに用いてPCRを行う。プライマーには、得られているペプチド断片のアミノ酸配列のどの部分を用いてもよいが、コドンの繰重が少なく、複雑な高次構造を形成しないと思われる配列を選ぶのが望ましい。また、RACE (Rapid Amplification of cDNA End: PCR PROTOCOLS A Guide to Methods and Applications, ACADEMIC press INC. p28～38) を行っても良い。

このようなPCRの錆型には、cDNAライブラリー、一本鎖cDNAを用いることが望ましい。PCR反応に逆転写酵素活性を有する耐熱性DNAポリメラ

ーゼを用いる場合には、poly (A)<sup>+</sup>RNA、場合によっては全RNAを用いても良い。

cDNAライブラリーを作製するためには、まずpoly (A)<sup>+</sup>RNAを鑄型にし、オリゴ(dT)プライマー、ランダムプライマー等を用い、逆転写酵素によって一本鎖cDNAを合成し、次にグブラー・ホフマン (Gubler and Hoffmann) 法、オカヤマーバーグ (Okayama-Berg) 法 (Molecular Cloning 2nd edition, Cold Spring Harbor press, 1989) 等により二本鎖cDNAを合成する。ラフィノース合成酵素遺伝子の発現量が少ない場合には、PCRを利用したcDNAライブラリー作製キット (Capfinder PCR cDNA Library Construction Kit (CLONTECH社) 等) を用いて、PCRによってcDNAを増幅してもよい。このようにして合成したcDNAは、平滑末端化、リンカーの付加、PCRによる制限酵素サイトの付加等を行うことにより、ファージベクター、プラスミド等のクローニングベクターにクローニングできる。

ハイブリダイゼーション用のプローブには、上記のPCRで得られたDNA断片のうち、ラフィノース合成酵素cDNAに特徴的な部分を選ぶ。また、5'末端側に近いDNA断片を選ぶのが望ましい。このように選んだ増幅DNA断片を、PCR反応液から精製する。この際、増幅したDNA断片をプラスミドを用いてサブクローニングし、プラスミドを大量調製してから制限酵素で切断し、電気泳動後にゲルを切り出して精製しても、また、プラスミドを鑄型にPCRを行って、目的部分だけを増幅して用いてもよい。さらには、最初に増幅したDNA断片の量が十分に多い場合には、増幅したDNA断片をサブクローニングせずに電気泳動し、目的DNA断片のバンドを含むゲル断片を切り出し、そのゲル断片から精製してもよい。

cDNAライブラリーから目的クローンを得るためのスクリーニングにはハイブリダイゼーションを行う。上記の方法で得られたDNA断片はラベルしてハイブリダイゼーションのプローブとすることができます。ラベルにはラジオアイソト

ープ、ビオチン等、種々のものを用いることができるが、ランダムプライミング法でラベルすることが望ましい。また、スクリーニングにはハイブリダイゼーションではなくPCRを用いてもよい。さらに、ハイブリダイゼーションとPCRを組み合わせてもよい。

上記のようにして得られたキュウリ由来のラフィノース合成酵素をコードするDNAの塩基配列、及びこの塩基配列から推定されるアミノ酸配列を配列表配列番号4に例示する。また、このアミノ酸配列のみを配列番号5に示す。後記実施例3で得られたラフィノース合成酵素をコードするDNAを含むDNA断片を含むプラスミドpMoss1oxCRSを保持するエシェリヒア・コリJM109の形質転換体AJ13263は、平成8年11月19日より、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（郵便番号305 日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号）にブダペスト条約に基づき国際寄託されており、受託番号FERMBP-5748が付与されている。

さらに、上記のようにして一つの植物から得られたラフィノース合成酵素遺伝子を利用して、他の植物からラフィノース合成酵素遺伝子を取得できる。ラフィノース合成酵素を得るために植物としては先に述べたラフィノースを合成している植物であれば何でもよく、例えば、ダイズ、ソラマメ、ナタネ、ヒマワリ、ワタ、シュガービートなどがある。例として、キュウリ由来ラフィノース合成酵素をコードするDNAを利用した、ダイズのラフィノース合成酵素をコードするDNAの取得について説明する。

ダイズのラフィノース合成酵素遺伝子は、ダイズ由来のp01y(A)+RN AからcDNAライブラリーを調製し、キュウリ由来ラフィノース合成酵素をコードするDNAの塩基配列に基づいて選択されたプローブを用いてcDNAライブラリーをスクリーニングすることによって取得することができる。

RNAの抽出部位としては、ラフィノース合成酵素が発現していればダイズ植物体のどこでもよいが、望ましくは種子、特に、開花後の未熟種子でラフィノース族オリゴ糖が生成している時期のものがよい。

ダイズ未熟種子より全RNAを抽出するには、効率よく損傷の少ないRNAが

得られるならば方法は特に制限されず、先のキュウリに関して述べた方法のいずれによっても可能である。

ハイブリダイゼーションのプローブは、ダイズ由来ラフィノース合成酵素遺伝子と相同性が高い配列を有する必要がある。ハイブリダイゼーションに用いるプローブは、キュウリ由来ラフィノース合成酵素遺伝子とすることもできるが、そのなかのラフィノース合成酵素の保存された領域をプローブにすることが望ましい。しかし、キュウリ由来ラフィノース合成酵素遺伝子の情報からでは、そのような配列を特定することはできない。このような配列を有するハイブリダイゼーションのプローブを得るには以下のようないくつかの方法による必要がある。簡便には、キュウリのラフィノース合成酵素遺伝子を適当な制限酵素で切断して得た断片を、それぞれ、ダイズRNAに対しノーザンハイブリダイゼーションを行い、ハイブリダイズするDNA断片をプローブとしてもよい。また、キュウリ由来ラフィノース合成酵素のアミノ酸配列に基づいて合成されたプライマーを用いダイズRNAを錆型としたRT-PCRによって得ることもできる。また、キュウリ由来ラフィノース合成酵素をコードするDNAと相同性のあるシロイスナズナEST配列に基づいて合成されたオリゴヌクレオチドをプライマーとして、シロイスナズナRNAのRT-PCRによって取得することができる。

好ましくは、次のようにして、目的の遺伝子と相同性の高いものを得る。まず、Gen Bankデータベースよりキュウリ由来ラフィノース合成酵素遺伝子に対し相同性を有するシロイスナズナなどのEST配列をGenetix Mac等のソフトウェアを用いて検索する。得られた配列と、キュウリラフィノース合成酵素遺伝子との間で相同性の高い領域は、様々な種に由来するラフィノース合成酵素間において保存されている配列を含むと考えられる。この領域のDNA断片を得るには、例えば、シロイスナズナのRNAより調製した一本鎖DNAを錆型とし、相同性の高い領域の配列に基づいて合成したオリゴヌクレオチドをプライマーとしてPCRにて増幅して得ることができる。この増幅断片の塩基配列を解析し、キュウリと相同性の高い配列を有するものを選ぶ。得られたDNA断片は、先に記載のように、ラベルし、プローブとして用いる。

cDNAライブラリーから目的クローンを得るためのスクリーニングには、キュウリ遺伝子のクローニングと同様にハイブリダイゼーションを行う。

上述のようにして得られたダイズ由来ラフィノース合成酵素をコードするDNAの塩基配列、及びこの塩基配列から推定されるアミノ酸配列を配列表配列番号23に示す。また、このアミノ酸配列のみを配列番号24に示す。上記方法で取得したキュウリ由来ラフィノース合成酵素に対するダイズ由来ラフィノース合成酵素の相同性は、ギャップを考慮したマキシマム・マッチングにより、アミノ酸配列では38%、塩基配列では50%であった。後記実施例4で得られたラフィノース合成酵素をコードするDNAを含むDNA断片を含むプラスミドpMOS S10xSRSを保持するエシェリヒア・コリJM109の形質転換体AJ13379は、平成9年10月20日から、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（郵便番号305 日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号）にブタペスト条約に基づき国際寄託されており、受託番号FERM BP-6149が付与されている。

キュウリ由来ラフィノース合成酵素と、ダイズ由来ラフィノース合成酵素の情報をを利用して、さらに他の植物からラフィノース合成酵素遺伝子を取得することができる。両タンパク質で保存されたアミノ酸配列、例えば、配列表配列番号28（配列番号24のアミノ酸番号199～208）、29（配列番号24のアミノ酸番号302～314）、30（配列番号24のアミノ酸番号513～527）などから推定される塩基配列を有する一本鎖DNA、及び、推定される塩基配列と相補的塩基配列を有する一本鎖DNAを合成し、これらをプライマーに用いてRT-PCRを行う。プライマーには上記配列のどの部分を用いてもよいが、コドンの縮重が少なく、複雑な高次構造を形成しないと思われる配列を選ぶのが望ましい。遺伝子を取得しようとする植物の全RNA、場合によっては、poly(A)<sup>+</sup>RNAよりcDNAを合成し、これを鑄型にしてPCRを行う。得られたDNA断片は適当なベクターにクローニングし塩基配列を解析し、この塩基配列がキュウリもしくはダイズ由来ラフィノース合成酵素遺伝子と相同性を有するか、または、翻訳したアミノ酸配列がキュウリ及びダイズ由来ラフィノース合成

酵素のアミノ酸配列と相同性を有するかどうか確認すればよい。これにより得られたD N A断片はc D N Aライブラリーのスクリーニングに用いることができる。また、遺伝子を取得しようとする植物の全R N A、場合によっては、p o l y (A)<sup>+</sup> R N Aより合成した一本鎖c D N Aを鑄型にして、R A C Eを行ってもよい。

本発明のD N Aは、コードされるラフィノース合成酵素の活性、すなわちスクロースとガラクチノールからラフィノースを生成する活性が損なわれない限り、1若しくは複数の位置での1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むラフィノース合成酵素タンパク質をコードするものであってもよい。ここで、「数個」とは、アミノ酸残基のタンパク質の立体構造における位置や種類によっても異なる。それは、イソロイシンとバリンのように、アミノ酸によっては、類縁性の高いアミノ酸が存在し、そのようなアミノ酸の違いが、タンパク質の立体構造に大きな影響を与えないことに由来する。従って、キュウリ由来ラフィノース合成酵素を構成する784アミノ酸残基全体に対し、35から40%以上の相同性を有し、ラフィノース合成酵素活性を有するものであってもよい。さらに、好ましくは、510番目のアミノ酸から610番目のアミノ酸の間において、65%以上の相同性を有することである。さらに好ましくは、「数個」が、2から40個、好ましくは、2から20個、さらに、2から10個である。また、ダイズ由来ラフィノース合成酵素を構成する750アミノ酸残基全体に対しても、同様に35から40%以上の相同性を有し、ラフィノース合成酵素活性を有するものであってもよい。さらに、好ましくは、478番目のアミノ酸から577番目のアミノ酸の間において、65%以上の相同性を有することである。ここでいう相同性とは、ギャップを考慮したマキシマム・マッチングを行ったときの値をいう。

遺伝子全長において、約50%以上の相同性があり、かつ、その中で約300塩基にわたる65%以上の相同性がある遺伝子を含む。そのような遺伝子は、G e n B a n kなどのデータベースを用いて、キュウリ由来ラフィノース合成酵素遺伝子に対し相同性を有する遺伝子を検索することによって、塩基配列情報を得

ことができる。ホモロジー解析プログラムはL i p m a n - P e a r s o n法を採用したG E N E T I X - M A C（遺伝子情報処理ソフトウェア、ソフトウェア開発社）などを用いてもよく、また、インターネット上に公開されているものを使用してもよい。このような方法により得られた塩基配列は遺伝子全長を含む場合と、遺伝子全長を含まない場合がある。遺伝子全長を含まない場合は、目的植物組織より抽出したRNAを鋳型に、キュウリ由来ラフィノース合成酵素遺伝子と相同性の高い部位に対応するプライマーを用い、5' R A C E法、3' R A C E法にて、容易に全長遺伝子を取得することができる。得られた全長遺伝子は、先に述べたような、Soluble Protein Expression System(INVITROGEN社)や、Tight Control Expression System (INVITROGEN社) や、QIAexpress System(QIAGEN社)などのキットが提供する適当な発現ベクターに組み込み、遺伝子を発現させ、記載の方法でラフィノース合成酵素活性を測定し、活性を有するクローニングを選抜すればよい。遺伝子の発現方法については、Plant Molecular Biology, A Laboratory Manual (Melody S. Clark (Ed.), Springer)などに詳しく記載されている。

このようなラフィノース合成酵素と実質的に同一のタンパク質をコードするDNAは、例えば部位特異的変異法によって、特定の部位のアミノ酸が置換、欠失、挿入、付加されるように塩基配列を改変することによって得られる。また、上記のような改変されたDNAは、従来知られている突然変異処理によっても取得され得る。突然変異処理としては、ラフィノース合成酵素をコードするDNAをヒドロキシルアミン等でインビトロ処理する方法、及びラフィノース合成酵素をコードするDNAを保持するエシェリヒア属細菌を、紫外線照射またはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン(NTG)もしくは亜硝酸等の通常人工突然変異に用いられている変異剤によって処理する方法が挙げられる。

また、上記のような塩基の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位等には、キュウリまたはダイズの個体差、品種間差、遺伝子の多コピー化、各器官、組織の違いに基づく場合などの天然に生じる変異も含まれる。

上記のような変異を有するDNAを、適当な細胞で発現させ、発現産物のラフ

ィノース合成酵素活性を調べることにより、ラフィノース合成酵素と実質的に同一のタンパク質をコードするDNAが得られる。また、変異を有するラフィノース合成酵素をコードするDNAまたはこれを保持する細胞から、例えば配列表の配列番号4に記載の塩基配列のうち、塩基番号56～2407からなる塩基配列、または、配列番号23に記載の塩基配列のうち、塩基番号156～2405からなる塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、ラフィノース合成酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAを単離することによっても、ラフィノース合成酵素タンパク質と実質的に同一のタンパク質をコードするDNAが得られる。ここでいう「ストリンジェントな条件」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。この条件を明確に数値化することは困難であるが、一例を示せば、相同性が高いDNA同士、例えば50%以上の相同性を有するDNA同士がハイブリダイズし、それより相同性が低いDNA同士がハイブリダイズしない条件、あるいは通常のサザンハイブリダイゼーションの洗いの条件である60°C、1×SSC、0.1%SDS、好ましくは、0.1×SSC、0.1%SDSに相当する塩濃度でハイブリダイズする条件が挙げられる。このような条件でハイブリダイズする遺伝子の中には途中にストップコドンが発生したものや、活性中心の変異により活性を失ったものも含まれるが、それらについては、市販の活性発現ベクターにつなぎラフィノース合成酵素活性を記述の方法で測定することによって容易に取り除くことができる。

尚、本発明のDNAを、ラフィノース合成酵素のアンチセンスRNAを発現させるために用いる場合には、このDNAは活性のあるラフィノース合成酵素をコードしている必要はない。また、センスRNAによっても、相同性のある内在性遺伝子の機能を抑制することができる。このような場合も、DNAが活性あるラフィノース合成酵素遺伝子をコードしている必要はなく、また、全長を含まなくともよく、好ましくは、60%以上の相同性を有する翻訳領域が500塩基対程度あればよい。このようなDNAの例としては、下記(e)又は(f)のDNAが挙げられる。

(e) 配列表の配列番号4に記載の塩基配列のうち、少なくとも塩基番号56～2407からなる塩基配列若しくはその相補的塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA。

(f) 配列表の配列番号23に記載の塩基配列のうち、少なくとも塩基番号156～2405からなる塩基配列若しくはその相補的塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA。

本発明者らが、目的とする、キュウリ由来またはダイズ由来のラフィノース合成酵素のcDNAのクローニングに成功した方法は上述の通りであるが、それ以外に下記の方法が挙げられる。

(1) キュウリ由来またはダイズ由来のラフィノース合成酵素を単離精製し、決定されるアミノ酸配列、または配列番号5または配列番号24に示すアミノ酸配列を基に全塩基配列を化学合成する。

(2) キュウリまたはダイズの植物体から染色体DNAを調製し、プラスミドベクター等を用いて染色体DNAライブラリーを作製し、このライブラリーからラフィノース合成酵素遺伝子を、ハイブリダイゼーション又はPCRによって取得する。尚、染色体由来のラフィノース合成酵素遺伝子は、コード領域にイントロンが含まれることが予想されるが、このようなイントロンによって分断されたDNAであっても、ラフィノース合成酵素をコードする限り本発明のDNAに含まれる。

(3) poly(A)<sup>+</sup>RNAを分子量等によって分画し、ホイートジャーム又はウサギ網状赤血球を用いたインビトロ翻訳系に供し、ラフィノース合成酵素活性を有するポリペプチドをコードするmRNAが存在する画分を決定し、それより目的のcDNA断片を作製、取得する。

(4) 抗キュウリラフィノース合成酵素抗体または抗ダイズラフィノース合成酵素抗体を作製し、タンパク質発現ベクターにcDNAライブラリーを乗せ、適当な宿主に感染させてcDNAがコードするタンパク質を発現させ、先程の抗体を用いて目的のcDNAをスクリーニングしても良い。

(5) ペプチド断片のアミノ酸配列から適当なプライマーを合成し、RACE法

によって、末端を含む配列を増幅し、これをクローニングしてもよい。

ラフィノース合成酵素遺伝子を発現させるには、酵素をコードする領域のDNAを種々の発現ベクターに組み込み遺伝子を発現させればよく、詳しくは、Plant Molecular Biology—A Laboratory Manual (M. S. Clark (eds.), Springer) などに記載されている。ベクターとしては、市販の発現ベクターを使用してもよい。発現の確認は、本明細書に記載の方法によって活性を測定することによって行うことができる。

例として、ダイズ由来ラフィノース合成酵素遺伝子によるラフィノース合成酵素の活性発現方法について説明する。pMOSStoxSRSのラフィノース合成酵素遺伝子の156番目の塩基のATGを含む上流すぐにNdeIの制限酵素サイトを、また2405番目の塩基の下流にBamHIサイトを、それぞれの制限酵素サイトを含むようにデザインしたプライマーを用いたPCRによって付加する。次に、フェノールクロロホルムにて精製した先のラフィノース合成酵素遺伝子とpET3aをNdeI、BamHIにて消化する。消化したそれぞれのDNAは、アガロースゲル電気泳動によって精製する。ダイズ由来ラフィノース合成酵素遺伝子の内部にはBamHIサイトが存在するので、あらかじめ、PCRなどによって変異を入れておくか、アガロース電気泳動によって目的サイズの断片を選ぶ。精製したラフィノース合成酵素断片と、ベクターはライゲーションし、ゲルで確認する。さらにラフィノース合成酵素遺伝子がATGコドンから開始することを塩基配列解析により確認する。このベクターをE. coli BL21 (DE3) pLysEに形質転換しクロラムフェニコールとアンピシリンを含むLB培地で選抜をする。形質転換体はPCRなどによってその挿入断片を確認し、目的の形質転換体をLB培地で培養し菌体を得る。菌体はSDSを含むゲルローディング緩衝液にて100℃、3分間インキュベートし、SDSポリアクリルアミドゲルにて電気泳動し、目的のサイズのタンパク質のバンドを確認する。この選抜された菌を培養し、菌体をソニックなどにより壊し、タンパク質を抽出する。このタンパク質抽出液のラフィノース合成酵素活性を本明細書に記載の方法で測

定すればよい。

### < 3 > 本発明のラフィノースの製造法

本発明のラフィノースの製造法においては、スクロース及びガラクチノールに上記ラフィノース合成酵素を作用させてラフィノースを生成させる。ラフィノース合成酵素は、スクロースとガラクチノールに作用させると、ガラクチノールを構成するガラクトース残基がスクロースに転移し、ラフィノースが生成する。その際、ガラクチノールを構成するミオイノシトールが生成する。

ラフィノースの製造に使用するラフィノース合成酵素は、植物体から抽出した酵素であっても、本発明のDNAを用いた遺伝子組換え法によって製造した酵素であってもよい。

スクロース及びガラクチノールにラフィノース合成酵素を作用させるには、ラフィノース合成酵素又はラフィノース合成酵素生産能を有する細胞をアルギン酸ゲルやポリアクリルアミドゲル等の担体に固定化した固定化酵素又は固定化細胞をカラムに充填し、このカラムにスクロース及びガラクチノールを含む溶液を通液してもよい。担体及びラフィノース合成酵素又は細胞を担体に固定化する方法は、通常のバイオリアクターに用いられる材料及び方法を採用することができる。

ラフィノース合成反応は、例えば、スクロース及びガラクチノールを含む水溶液又は緩衝液等の溶液に、ラフィノース合成酵素を添加することによって行われる。前記溶液のpHは、約6～8の範囲内、特にpH7前後に調整されることが好ましい。また、反応温度は約28～42°C、好ましくは35～40°Cの範囲内、特に38°C前後であることが好ましい。尚、本発明のラフィノース合成酵素は、約pH5～8の範囲、特にpH6付近で安定である。また、本酵素は少なくとも約40°C以下の温度範囲で安定である。

本発明のラフィノース合成酵素は、ヨードアセトアミド、N-エチルマレイミド、MnCl<sub>2</sub>、ZnCl<sub>2</sub>、NiCl<sub>2</sub>によって酵素活性が阻害されるので、これらの物質が反応液に含まれないことが望ましい。

反応液に加えるガラクチノール及びスクロースの濃度は、ガラクチノール5 mM以上、スクロース1.5 mM以上が好適である。また、反応液に加えるラ

フィノース合成酵素の添加量は、基質量に応じて添加すればよい。

反応液に含まれる未反応のスクロース、ガラクチノール及び酵素反応により生じるミオイノシトールからラフィノースを分離する方法としては、例えばゲルfiltrationクロマトグラフィーが挙げられる。

#### < 4 > 本発明のキメラ遺伝子及び形質転換植物

本発明のキメラ遺伝子は、ラフィノース合成酵素遺伝子又はその一部と、植物細胞で発現可能な転写制御領域とを含む。ラフィノース合成酵素遺伝子としては、前記<2>に記載した本発明のラフィノース合成酵素をコードするDNAが挙げられる。さらに、本発明のキメラ遺伝子をアンチセンス遺伝子として利用する場合には、ラフィノース合成酵素をコードするDNAの他に、ラフィノース合成酵素遺伝子の非翻訳領域又はその一部であっても、使用できる場合がある。非翻訳領域としては、例えば配列表配列番号4において塩基番号1～55(5'非翻訳領域)、あるいは2407～2517に示す配列(3'非翻訳領域)、また、配列表配列番号23においては塩基番号1～155、あるいは2406～2765が挙げられる。

本発明のキメラ遺伝子において、転写制御領域が、ラフィノース合成酵素をコードするDNAに、このDNAコード鎖に相同なmRNA(センスRNA)を発現するように連結されている場合は、このキメラ遺伝子が導入された植物細胞はラフィノース合成酵素を発現し、ラフィノース族オリゴ糖含量が増加する。一方、前記転写制御領域が、前記DNAのコード鎖に相補的な配列を有するRNA(アンチセンスRNA)を発現するように前記DNAに連結されている場合、および、ラフィノース合成酵素遺伝子の一部の断片、好ましくは、上流コード領域の約200塩基対以上に対するセンスRNAを発現するように連結されている場合、これらのキメラ遺伝子が導入された植物細胞は、内在性ラフィノース合成酵素の発現が抑制され、ラフィノース族オリゴ糖が低減化する。

上記のように、本発明のキメラ遺伝子で植物を形質転換し、この遺伝子を植物細胞内で発現させることにより、前記植物のラフィノース族オリゴ糖含量を変化させることができる。

本発明を適用する植物としては、油糧植物であるダイズ、ナタネ、ワタ、砂糖を生産するテンサイ、サトウキビ、モデル植物としてシロイヌナズナ等が挙げられる。

また、植物細胞で発現可能な転写制御領域としては、前述したような、植物全体で発現するCaMV 35S RNAプロモーター、CaMV 19S RNAプロモーター、ノパリン合成酵素プロモーター等、緑色組織で発現するRubis CO小サブユニットプロモーター等、種子などの部位特異的に発現するナピン(napin)、ファセオリン(phaseolin)等の遺伝子のプロモーター領域等が挙げられる。また、キメラ遺伝子の3'末端には、ノパリン合成酵素ターミネーター、Rubis CO小サブユニット3'側部位等のターミネーターが連結されてもよい。

キメラ遺伝子で植物を形質転換には通常用いられている方法、アグロバクテリウム法、パーティクルガン法、エレクトロポレーション法、PEG法等を、供試する宿主細胞に応じて用いればよい。

植物にキメラ遺伝子を導入する形質転換法としては、アグロバクテリウム法、パーティクルガン法、エレクトロポレーション法、PEG法等が挙げられる。

アグロバクテリウム法として具体的には、バイナリーベクターを用いる方法がある。すなわち、Tiプラスミド由来のT-DNA、大腸菌などの微生物で機能可能な複製起点、及びベクターを保持する植物細胞または微生物細胞を選択するためのマーカー遺伝子を含むベクターを植物に感染させ、この植物から採取した種子を生育させ、マーカー遺伝子の発現を指標としてベクターが導入された植物を選択する。得られた植物について、ラフィノース合成酵素活性を測定するか、あるいはラフィノース族オリゴ糖の含量が変化したものを選択することによって、目的とする形質転換植物を取得することができる。

以下に、ダイズにキメラ遺伝子を導入する方法について説明する。ダイズ形質転換には、パーティクルガン法(Pro. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 145 (1989)、TIBTECH, 8, 145 (1990)、Bio/Technology, 6, 923 (1988)、Plant Physiol., 87, 671 (1988)、Develop. Genetics, 11, 289 (1990)、Plant cell Tissue & Organ

Culture, 33, 227 (1993)）、アグロバクテリウム法（Plant Physiol., 91, 1212 (1989)、WO94/02620、Plant Mol. Biol., 9, 135 (1987)、Bio/Technology, 6, 915 (1988)）、エレクトロポレーション法（Plant Physiol., 99, 81 (1992)、Plant Physiol., 84, 856 (1989)、Plant Cell Reports, 10, 97 (1991)）のいずれの方法も用いることができる。

パーティクルガン法においては、エンブリオジェニック (embryogenic) 組織、あるいは、開やすく後30日から40日の未熟種子の胚軸を用いればよい。約1gのエンブリオジェニック組織をペトリ皿に広げ、目的のキメラ遺伝子をコーティングした金粒子、タンクスチン粒子などを打ち込めばよい。組織は、1時間から2時間後液体培地に移し、培養する。2週間後、形質転換体選抜のための抗生物質入りの培地に移し、培養する。6週間後に、緑色の耐性不定胚が得られるので、これをさらに新しい培地に移して培養し、植物体を再生させる。あるいは、胚軸を用いた場合には、胚軸を無菌的に摘出し、パーティクルガンで処理した後、高濃度のサイトカイニンを含むMS培地 (Murashige and Skoog, Physiologia Plantrum, 15, 473-497 (1962)) にて培養をする。暗黒下で、2週間培養した後、サイトカイニンの含量を低下させたMS培地にて12時間から16時間、光照射下で室温で培養する。このとき、選抜マーカーとして用いた抗生物質を培地に添加しておくことが望ましい。移植組織より多芽体が形成したら、ホルモン無添加の培地に移すことで、発根させる。この幼植物体を温室に移し、栽培する。

アグロバクテリウムを用いる方法では、植物組織としてコチルドナリーノッド (Cotyledonary nod) を用いることが望ましい。アグロバクテリウムは、市販のLBA4404、C58、Z707などを用いることができるが、望ましくは、Z707がよい。ベクターは、pMON530 (Monsanto Co.) に目的遺伝子を挿入したプラスミドなどを用いることができる。ダイレクト・フリーズ・ソー (Direct freeze thaw) 方法 (An et al., Plant Mol. Biol. Manual A3:1-19, 1988) などによって、アグロバクテリウム ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) Z707 (Hepburn et al., J. Gen. Microbiol., 131, 2961 (1985)) にプラスミドを導入する。このキメラ遺伝子で形質転換したアグロバクテ

リウムは、一晩培養し、5000 r p m、5分間遠心し、B5懸濁培地に懸濁する。ダイズ種子は滅菌し1/10濃度のB5培地にて3日間培養し、発芽させる。子葉を切り出し、アグロバクテリウムの懸濁液で、2時間供培養する。この子葉をB5培地（ガンボルグ(Gamborg)B5塩(Exp. Cell. Res., 50, 151 (1968)、ガンボルグB5ビタミン、3%スクロース。5 μMベンジルアミノプリン、10 μM IBA、100 μM アセトシリンゴン含有）に移し、25°C、23時間光照射（60 μE<sup>-2</sup>S<sup>-1</sup>）の条件下で3日間培養する。次に、アグロバクテリウムを除去するためにB5培地（5 μM ベンジルアミノプリン、100 mg/L カルベニシリン、100 mg/L バンコマイシン、500 mg/L セファタキシム(cefotaxime)）にて4日間25°Cで毎日培地を交換しながら培養する。その後、B5培地（200 mg/L カナマイシン）にて培養する。1から2ヶ月でマルチシュートが形成される。これを、B5培地（0.58 mg/L ジベレリン、50 mg/L カナマイシン）で培養し、シュートを伸長させる。次に、B5培地（10 μM IBA）に移し、発根させる。発根した幼植物体は、馴化し、温室にて栽培することによって形質転換体を得ることができる。

ラフィノース合成酵素遺伝子を導入した形質転換体植物の確認は、形質転換体より、DNAを抽出し、ラフィノース合成酵素遺伝子をプローブに用いてサザンハイブリダイゼーションを行えば容易に確認できる。

#### 図面の簡単な説明

図1は、ラフィノース合成反応によって生じるラフィノース生成量と反応時間との関係を示す図。

図2は、ラフィノース合成酵素のSDS-ポリアクリラミドゲル電気泳動の結果を示す模式図。Mは分子量マーカーを、Sはラフィノース合成酵素を含む試料を示す。数字は分子量（kDa）を表す。

図3は、ラフィノース合成酵素活性に対する反応温度の影響を示す図。

図4は、ラフィノース合成酵素活性に対する反応pHの影響を示す図。

図5は、ラフィノース合成酵素活性に対するミオイノシトールの影響を示す図。

図6は、ラフィノース合成酵素の安定pH範囲を示す図。

図7は、合成プライマーとペプチドのアミノ酸配列との関係を示す図。RはA又はGを、YはC又はTを、MはA又はCを、KはG又はTを、DはG、A又はTを、HはA、T又はCを、BはG、T又はCを、NはG、A、T若しくはCを、Iはイノシンを表す。

### 発明を実施するための最良の形態

以下に、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。

はじめに、以下の実施例において、各精製工程における活性画分の確認及び酵素の特性検討に用いたラフィノース合成酵素活性の測定法を説明する。

#### ＜ラフィノース合成酵素活性測定法＞

ラフィノース合成酵素の活性は、ラフィノース合成反応により生成したラフィノースをHPLC（高速液体クロマトグラフィー）により定量することによって行った。HPLCは、糖分析システムDX500（CarboPac PA1カラム、パルスドアンペロメトリー検出器（ダイオネクス社製））を用いて行った。

ラフィノース合成反応は、最終濃度が下記の組成になるように調製した反応液に10～50μlのラフィノース合成酵素液を添加して100μlとし、32℃で60分間、反応を行った。

#### 〔反応液組成（最終濃度）〕

2.5 mM スクロース

5 mM ガラクチノール

5 mM DTT

20 mM トリス塩酸緩衝液（pH 7.0）

上記のようにして反応を行った後、反応液の4倍容のエタノールを加え、95℃で30秒間加熱して反応を停止した。これを遠心し、遠心上清を減圧乾固した後、蒸留水に溶解し、糖分析システムにて反応生成物中のラフィノースを定量し、ラフィノース酵素活性とした。

## 実施例1 キュウリからのラフィノース合成酵素の精製

## &lt;1&gt;キュウリからのラフィノース合成酵素の抽出

播種後6～10週間のキュウリ（品種「SUYOU」）本葉より、葉脈系を集め、液体窒素にて凍結し、-80°Cにて保存した。凍結した葉脈系約200gを液体窒素下で乳鉢にて磨碎し、緩衝液1（40mM トリス塩酸緩衝液（pH 7.0）、5mM DTT、1mM PMSF（フェニルメタンスルフォニルフルオリド）、1%ポリクラールAT；セルバ社製）を加え、タンパク質を抽出した。抽出液は、ガーゼやミラクロス（カルバイオケムーノバイオケム(Calbiochem-Novobiochem)社）などのフィルターにて濾過し、濾液を4°C、約30,000×gで60分間遠心した。得られた遠心上清を粗抽出液とした。

## &lt;2&gt;陰イオン交換クロマトグラフィー（1）

上記で得られた粗抽出液約560mlを、緩衝液2（20mM トリス塩酸緩衝液（pH 7.0）、5mM DTT）にて平衡化した強塩基性陰イオン交換クロマトグラフィーカラム（HiTrap Q；ファルマシア社製、1.6cm×2.5cm）を5本連結したカラムに供し、ラフィノース合成酵素活性をカラムに吸着させた。続いてカラムの5倍容の緩衝液3（20mM トリス塩酸緩衝液（pH 7.0）、0.2M NaCl、5mM DTT）にてカラムを洗浄して非吸着タンパク質を洗い流した後、50mlの緩衝液4（20mM トリス塩酸緩衝液（pH 7.0）、0.3M NaCl、5mM DTT）にてラフィノース合成酵素活性をカラムから溶出させた。

## &lt;3&gt;陰イオン交換クロマトグラフィー（2）

上記の溶出液約75mlを透析チューブ（Pore membranes MWC O：10,000；スペクトラ(Spectra)社製）に入れ、10Lの緩衝液5（20mM トリス塩酸緩衝液（pH 7.0）、0.05M NaCl、5mM DTT）に対して、4°Cで一晩透析した。透析した試料を緩衝液5で平衡化した弱塩基性陰イオン交換クロマトグラフィーカラム（DEAE-TOYOPEARL；東ソー社製、2.2×20cm）に供し、ラフィノース合成酵素活性をカラムに吸着させた。続いてカラムの5倍容の緩衝液5にてカラムを洗浄して非吸着

タンパク質を洗い流した後、20カラム容に対し0.05M～0.35MのNaCl濃度勾配を直線的にかけて酵素活性を溶出し分画した。

#### <4>ゲル濾過クロマトグラフィー

上記で得られた溶出液約160mlを、濃縮器（セントリプレップ10；Amicon社製）を用いて6.5mlに濃縮した。この濃縮液3mlずつをゲルろ過クロマトグラフィーカラム（Superdex 200 pg；ファルマシア社製、2.6cm×60cm）に供した。カラムの平衡化と溶出は、緩衝液6（20mMトリス塩酸緩衝液（pH7.0）、0.1M NaCl、5mM DTT、0.02% Tween 20）を用いて行った。分画した各画分のうち、ラフィノース合成酵素活性を有する画分を集めた。

#### <5>ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィー

ゲル濾過で分画したラフィノース合成酵素活性画分約25mlを、セントリプレップ10にて濃縮し、さらに、緩衝液7（0.01M リン酸ナトリウム緩衝液（pH7.0）、5mM DTT、0.02% Tween 20）を用いて緩衝液交換を行った。得られた濃縮液約1.2mlを、あらかじめ同緩衝液にて平衡化したハイドロキシアパタイトカラム（Bio-Scale CHT-1；バイオラッド社製、0.7×5.2）に供し、ラフィノース合成酵素活性を吸着させた。カラムを、カラム体積の5倍量（10ml）の同緩衝液にて洗浄した後、20カラム容に対し、0.01M～0.3Mのリン酸濃度勾配を直線的にかけて酵素活性を溶出し分画した。

#### <6>ハイドロキシアパタイトリクロマトグラフィー

上記のようにして得られたハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーによる活性画分を同様にしてリクロマトし、精製ラフィノース合成酵素画分（約2ml）とした。

本活性画分のタンパク質量は約200μgであった。また、全活性は5700nmol／時間であり、タンパク質当たりの比活性は約28μmol／時間／mgであった。この活性画分は、後述するように電気泳動上で分子量約90kDa～100kDaの单一バンドを示すタンパク質のみを含んでいた。得られた精製

酵素標品の比活性は、粗抽出液の約2000倍であり、HiTrapQによる強塩基性陰イオン交換クロマトグラフィー後の酵素量に対する回収率は12%であった。精製の結果を表1にまとめた。

表1

	全タンパク質 m g	全活性 nmol/h	比活性 nmol/h/mg	収率 %
粗抽出液	1915	20700	11	—
HiTrapQ	1092	48800	45	100
DEAE-TOYOPERAL	540	33000	61	68
Superdex 200pg	1.79	26500	14800	54
ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィー(1)	0.51	12600	24700	26
ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィー(2)	0.20	5700	28500	12

## 実施例2 ラフィノース合成酵素の特性の検討

実施例1で得られた精製ラフィノース合成酵素の特性を検討した。

### <1>分子量測定

#### (1) ゲルろ過クロマトグラフィー

精製ラフィノース合成酵素を10 $\mu$ lとり、この試料および分子量マーカー(ゲルろ過用分子量マーカーキット：ファルマシア社製)をゲルろ過クロマトグラフィーカラム(Superdex 200pg；ファルマシア社製)に供した。カラムの平衡化と溶出は、緩衝液6(20mMトリス塩酸緩衝液(pH7.0)、0.1MNaCl、5mMDTT、0.02%Tween 20)を用いて行った。その結果、ラフィノース合成酵素の分子量は、約75kDa～95kDaと推定された。

#### (2) ポリアクリルアミドゲル電気泳動(Native PAGE)

精製ラフィノース合成酵素を10 $\mu$ lとり、同量のサンプル緩衝液(0.0625Mトリス-塩酸(pH6.8)、15%グリセロール、0.001%BPB)

を加え、電気泳動サンプルとした。このサンプル  $10\ \mu\text{l}$  を  $10\%$  ポリアクリルアミドゲル（第一化学薬品製、マルチゲル 10）に供し、 $0.025\text{M}$  トリス- $0.192\text{M}$  グリシン緩衝液( $\text{pH}\ 8.4$ )で  $40\text{mA}$ 、約  $60$  分泳動した。泳動後、シルベストスティン銀染色キット（ナカライトスク社製）にて染色した。その結果、分子量は約  $90\text{ kDa} \sim 100\text{ kDa}$  と推定された。

### （3） SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）

精製ラフィノース合成酵素を  $10\ \mu\text{l}$  とり、同量のサンプル緩衝液 ( $0.0625\text{M}$  トリス-塩酸( $\text{pH}\ 6.8$ )、 $2\%$  SDS、 $10\%$  グリセロール、 $5\%$  メルカプトエタノール、 $0.001\%$  BPP) を加え沸騰浴中で  $1$  分間加熱し、電気泳動サンプルとした。このサンプル  $10\ \mu\text{l}$  を  $10 \sim 20\%$  グラジエントポリアクリルアミドゲル（第一化学薬品製）に供し、 $0.1\%$  SDSを含む  $0.025\text{M}$  トリス- $0.192\text{M}$  グリシン緩衝液 ( $\text{pH}\ 8.4$ ) で  $40\text{mA}$ 、約  $70$  分泳動した。泳動後、シルベストスティン銀染色キット（ナカライトスク社製）にて染色した。結果を図 2 に示す。その結果、分子量は約  $90\text{ kDa} \sim 100\text{ kDa}$  と推定された。

#### < 2 > 反応至適温度

前記のラフィノース合成酵素活性測定法にしたがって、種々の温度条件下 ( $28^\circ\text{C}$ 、 $32^\circ\text{C}$ 、 $36^\circ\text{C}$ 、 $40^\circ\text{C}$ 、 $44^\circ\text{C}$ 、 $48^\circ\text{C}$ 、 $52^\circ\text{C}$ ) でラフィノース合成酵素活性を測定した。各反応液に加えた酵素液は、 $2\ \mu\text{l}$  とした。 $32^\circ\text{C}$ での酵素活性を  $100$  としたときの各温度での相対活性を図 3 に示す。その結果、ラフィノース合成酵素は、約  $25 \sim 42^\circ\text{C}$  にわたる範囲で活性を示し、反応至適温度は、 $35 \sim 40^\circ\text{C}$  付近であった。

#### < 3 > 至適反応 pH

前記のラフィノース合成酵素活性測定法にしたがって、種々の pH 条件下 ( $\text{pH}\ 4 \sim 11$ ) でラフィノース合成酵素活性を測定した。各反応には、 $50\text{mM}$  クエン酸緩衝液 ( $\text{pH}\ 4 \sim 6$ )、 $50\text{mM}$  リン酸カリウム緩衝液 ( $\text{pH}\ 5.5 \sim 7.5$ )、 $50\text{mM}$  ビス-トリス緩衝液 ( $\text{pH}\ 6 \sim 7$ )、 $20\text{mM}$  トリス-塩酸緩衝液 ( $\text{pH}\ 7 \sim 8.5$ )、 $50\text{mM}$  グリシン-NaOH 緩衝液 ( $\text{pH}\ 9$ )

～11) を用いた。また、各反応液に加えた酵素液は、2  $\mu$  lとした。結果を図4に示す。

その結果、ラフィノース合成酵素はpH 5～10の範囲で活性を示し、反応至適pHは、用いた緩衝液の種類によっても異なるが、6～8付近であった。

#### <4> 阻害剤及び金属イオンの検討

精製ラフィノース合成酵素の反応液に、各種の酵素阻害剤又は金属イオンを終濃度で1 mMとなるように添加し、ラフィノース合成酵素活性を前記と同様にして測定した。阻害剤又は金属イオンを添加しない場合の酵素活性に対する残存活性を表2に示す。ヨードアセトアミドは酵素活性を顕著に阻害し、N-エチルマレイミドも阻害効果を示した。また、CaCl<sub>2</sub>、CuCl<sub>2</sub>、MgCl<sub>2</sub>は阻害効果がほとんど認められなかつたが、MnCl<sub>2</sub>、ZnCl<sub>2</sub>、NiCl<sub>2</sub>は阻害効果を示した。

表2

阻害剤又は金属イオン	残存活性 (%)
無添加	100
ヨードアセトアミド	0
N-エチルマレイミド	40
CaCl <sub>2</sub>	115
CuCl <sub>2</sub>	101
MgCl <sub>2</sub>	96
MnCl <sub>2</sub>	32
ZnCl <sub>2</sub>	42
NiCl <sub>2</sub>	68

#### <5> ミオイノシトールによる阻害

ラフィノース合成反応の反応生成物であるミオイノシトールによる阻害を調べた。各種濃度のミオイノシトールを反応液に添加し、ラフィノース合成酵素活性を測定した。結果を図5に示す。添加したミオイノシトールの濃度とともに酵素

活性は阻害された。

#### < 6 > 安定 pH

50 mM ビストリス塩酸緩衝液 (pH 5~8、0.5 mM DTT を含む)、又は 20 mM トリスー塩酸緩衝液 (pH 7~8、0.5 mM DTT を含む) 中で、前記陰イオン交換クロマトグラフィー (2) で得られたラフィノース合成酵素画分を 4 時間、4 °C にてインキュベートした後、ラフィノース合成酵素活性を測定した。インキュベートに用いた緩衝液の pH に対する酵素活性を図 6 に示す。いずれのインキュベート条件においてもラフィノース合成活性が認められ、特に pH 5~7.5 の範囲で安定であった。

#### < 7 > 安定温度

20 mM トリスー塩酸緩衝液 (pH 7、5 mM DTT を含む) にて、前記陰イオン交換クロマトグラフィー (2) で得られたラフィノース合成酵素画分を 28 °C、32 °C、37 °C 又は 40 °C で 60 分インキュベートした後、ラフィノース合成酵素活性を測定した。その結果、本酵素は、28 °C~40 °C の範囲で前記インキュベート処理を行わなかった対照区と比較して 80%~100% の活性を有し、安定であった。

#### < 8 > アミノ酸配列の解析

精製ラフィノース合成酵素のシステイン残基を還元ピリジルエチル化し、脱塩した。これをリジルエンドペプチダーゼ (Achromobacter protease 1、和光純薬工業社製) にて 37 °C、12 時間消化し、ペプチド断片化した。得られたペプチド混合液を逆相 HPLC (カラム: ウォーターズ  $\mu$ Bondasphere ( $\phi$  2.1 × 150 mm, C<sub>18</sub>, 300 Å)、ウォーターズ社製(ミリポア社)) に供し、各ペプチド断片を分離取得した。溶媒には 0.1% TFA (トリフルオロ酢酸) を用い、アセトニトリルの濃度勾配により溶出を行った。取得したペプチド断片のうち、3 つの断片について、アミノ酸配列をプロテインシークエンサーにより決定した。決定された各ペプチドのアミノ酸配列を配列表配列番号 1~3 に示す。以下、これらのペプチドを、それぞれ順にペプチド 1、2、及び 3 という。

## 実施例3 キュウリ由来ラフィノース合成酵素をコードするDNAの取得

## &lt;1&gt; PCR法によるラフィノース合成酵素cDNAの部分断片の単離

キュウリの主葉脈22gを液体窒素中で乳鉢を用いて磨碎した。この磨碎物を、80°Cに余熱した抽出バッファー(100mM塩化リチウム、100mMトリス-塩酸(pH 8.0)、10mM EDTA、1% SDS)と等量のフェノールを混合したものに加え、攪拌後、フェノールと等量のクロロホルム：イソアミルアルコール(24:1)を加え、再び攪拌を行い、この混合液を4°Cで9250×g、15分間遠心処理し、上清を採取した。この上清に対して繰り返しフェノール処理、クロロホルム：イソアミルアルコール処理を行い、遠心上清を得た。この上清に等量の4M塩化リチウムを加え、-70°Cで1時間静置した。

室温にて解凍後、4°Cで9250×g、30分間遠心処理し沈殿を得た。この沈殿を2M塩化リチウム、80%エタノールにより1回ずつ洗浄し、乾燥後2mlのジエチルピロカーボネート処理水に溶解し、精製全RNAとした。得られた全RNAは2.38mgであった。

この全RNA全量を、オリゴ(dT)セルロースカラムを用いたpoly(A)<sup>+</sup>RNA精製キット(STRATAGENE CLONING SYSTEMS社製)に供し、poly(A)<sup>+</sup>RNA分子を精製し、42.5μgのpoly(A)<sup>+</sup>RNAを得た。

上記のようにして得られたpoly(A)<sup>+</sup>RNAから逆転写酵素Super Script III(GIBCO BRL社製)を用いて一本鎖cDNAを合成した。このcDNA混合物からラフィノース合成酵素cDNAを単離するために、PCR法による增幅を行った。PCRに用いるプライマーは、実施例2で決定したキュウリ由来のラフィノース合成酵素のペプチド断片のアミノ酸配列から、図7に示す一本鎖オリゴヌクレオチド(配列番号6～22)を合成した。各プライマーの配列において、RはA又はGを、YはC又はTを、MはA又はCを、KはG又はTを、DはG、A又はTを、HはA、T又はCを、BはG、T又はCを、NはG、A、T若しくはC、又はイノシン(塩基はヒポキサンチン)を、それぞれ表す。

プライマーとして、5' 側プライマーにA (A 1 (配列番号6)、A 2 (配列番号7)、A 3 (配列番号8)、A 4 (配列番号9))、3' 側プライマーにD' (D' 1 (配列番号21)、D' 2 (配列番号22)) の組み合わせと、5' 側プライマーにC 2 (配列番号14))、及び3' プライマーにB' 1 (配列番号18)、あるいはB' 2 (配列番号19)を用いたときに、約540塩基対のDNAが増幅された。この断片をTAクローニングキット (INVITROGEN BV社製) を用いてプラスミドpCR IIにクローニングし、塩基配列を解析したところ、両末端のプライマー配列の内側にペプチド1、2のアミノ酸配列をコードしている塩基配列が存在し、前記増幅断片はラフィノース合成酵素遺伝子に由来するDNA断片であることがわかった。

さらに、クローニングした上記PCR増幅DNA断片のラフィノース合成酵素遺伝子上での位置を特定するために、RACEキット (3' Ampifinder RACE Kit (CLONTECH社製)) を用いて、3' RACEを行った。

前記cDNA混合物を鋳型に、5' 側プライマーにC (C 1 (配列番号13)、C 2 (配列番号14))、3' 側プライマーにはオリゴ(dT)とアンカー配列を有するプライマーを用いてPCRを行い、さらにこうして得られた増幅断片を鋳型に、Cより内側に位置するD (D 1 (配列番号15)、D 2 (配列番号16)) を5' 側プライマーに、3' 側プライマーにはオリゴ(dT) - アンカープライマーを用いてPCRを行った。その結果、C 1 (配列番号13)、C 2 (配列番号14)とオリゴ(dT) - アンカープライマーで増幅したDNAを鋳型に、D 2 (配列番号16)とオリゴ(dT) - アンカープライマーでPCRを行ったときのみ、約2400塩基対のDNA断片が増幅した。また、5' 側プライマーにC (C 1 (配列番号13)、C 2 (配列番号14))、3' 側プライマーにはオリゴ(dT) - アンカープライマーを用いてPCRを行い、さらにこうして得られた増幅断片を鋳型に、5' 側プライマーにE (配列番号17)、3' 側プライマーにはオリゴ(dT) - アンカープライマーを用いてPCRを行った。その結果、いずれの場合も、約300塩基対のDNA断片を増幅した。

同様に、前記 c DNA 混合物を鑄型に、5' 側プライマーに A (A 1 (配列番号 6)、A 2 (配列番号 7)、A 3 (配列番号 8)あるいは A 4 (配列番号 9))、3' 側プライマーにはオリゴ (dT) とアンカー配列を有するプライマーを用いて PCR を行い、さらにこうして得られた增幅断片を鑄型に、A より内側に位置する B (B 1 (配列番号 10)、B 2 (配列番号 11)あるいは B 3 (配列番号 12))、3' 側に同じオリゴ (dT) - アンカープライマーを用いて PCR を行った。その結果、A のいずれのプライマーを用いたときも、B 2 プライマーを用いたときに約 2000 塩基対の DNA 断片を得た。そこで、A 2、B 2 プライマーを用いて増幅した DNA 断片をクローニングした。塩基配列を解析したところ、5' 側にプライマー作成に用いたペプチド断片 1 のアミノ酸配列をコードする塩基配列が存在した。また、3' 側には poly (A) 配列と、その上流にペプチド断片 3 に対応する塩基配列が存在した。

先の PCR の結果と合わせると、ラフィノース合成酵素ペプチド断片は、その N 末端側から 2、1、3 の順に並んでおり、先に PCR によって得られた約 540 塩基対の DNA 断片は、ラフィノース合成酵素遺伝子上の 5' 末端に近い部分であることがわかった。ラフィノース合成遺伝子全長を含む c DNA クローンをスクリーニングするためには、プローブとする DNA が 5' 末端側に近い部分を検出できることが望ましいため、この DNA 断片をプローブとして c DNA ライブライバーのスクリーニングに使用した。

#### < 2 > ラフィノース合成酵素 c DNA のコード領域全長のクローニング

まず、以下のようにして c DNA ライブライバーを作製した。< 1 >で得られた poly (A)<sup>+</sup> RNA 3.8 μg から Time Saver c DNA 合成キット (Pharmacia Biotech 社製) を用いて、2 本鎖 c DNA を合成した。得られた c DNA を、λ ファージベクター λ MOSS 10 X (Amersham 社製) の Eco RI 制限酵素切断部位に組み込んだ後、Giga pack II Gold パッケージングキット (STRATAGENE CLONING SYSTEMS 社製) を用いて、ファージタンパク質中に取り込ませ、キュウリの c DNA ライブライバーを調製した。なお、本ライブライバーのタイマーは

1.  $4.6 \times 10^7$  p f u /  $\mu$  g ベクターであった。

上記のキュウリの c DNA ライブライリーから  $1.4 \times 10^5$  p f u に相当する ファージを宿主細胞エシェリヒア・コリ ER1647 に感染させた後、直径 9.0 mm の寒天プレート 14 枚に、プレートあたり  $1.0 \times 10^4$  p f u となるよう に蒔いた。これを 37 °C で約 6.5 時間培養した後、プレート上に形成された ファージplaques をナイロンメンブレン (Amersham 社製 Hybond - N+) に転写した。

次に、上記ナイロンメンブレンを、アルカリで処理して転写された DNA を変性させ、中和した後に洗浄した。その後、このナイロンメンブレンを 80 °C で 2 時間処理することで DNA をメンブレン上に固定した。

得られたナイロンメンブレンに対し、<1>で得た約 540 塩基対の DNA 断片をプローブに用い、陽性クローンのスクリーニングを行った。上記の約 540 塩基対の DNA 断片を、制限酵素 EcoRI で消化後に電気泳動し、約 540 塩基対のインサートのみを切り出して精製したものを、DNA ラベル・検出システム (Gene Images ラベリング・検出システム (Amersham 社製)) を用いてフルオレセインラベルし、プローブとした。前記のナイロンメンブレンを 60 °C で 30 分間、プレハイブリダイゼーションを行い、次いでラベルしたプローブを加えて 60 °C で 16 時間のハイブリダイゼーションを行った。ラベルされた DNA を検出するための抗体 (アルカリリフォスファターゼ標識抗フルオレセイン抗体) は、50000 倍に希釀して用いた。このスクリーニングにおいて陽性クローンの候補株を得た。得られた候補株について上記と同様にしてスクリーニングをさらに 2 回繰り返し、純化した陽性クローンを取得した。

上記の陽性クローンをエシェリヒア・コリ BM25.8 に感染させ、カルベニシリソを含む選択培地上で培養することで、c DNA を含むプラスミドベクター pMOSSTox-CRS を切り出した。このプラスミドの挿入 c DNA の長さは約 2.5 kb であった。さらにこのプラスミドで腸菌 JM109 を形質転換し、形質転換体からプラスミド DNA を調製し、これを塩基配列を解析するための試料とした。

挿入cDNAの塩基配列の解析にはTaq DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (Perkin-Elmer社製)を用いる従来公知の方法で行った。

その結果、配列表の配列番号4に示す2352塩基対よりなる塩基配列が明らかとなった。この配列中には、本発明者らが用いたDNAプローブの塩基配列と一致する部分が存在した。また、塩基配列から翻訳されるアミノ酸配列を配列番号4及び配列番号5に示した。このアミノ酸配列中には、本発明者らが得たキュウリ由来のラフィノースシンターゼのペプチド1(配列番号5中、アミノ酸番号215～244)、2(配列番号5中、アミノ酸番号61～79)及び3(配列番号5中、アミノ酸番号756～769)と一致する部分が存在し、ラフィノース合成酵素をコードすることが確認された。

上記のようにして得られたラフィノース合成酵素をコードするDNAを含むプラスミドpMoss1oxCRSを保持するエシェリヒア・コリJM109の形質転換体AJ13263は、平成8年11月19日より、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(郵便番号305 日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号)にブダペスト条約に基づき国際寄託されており、受託番号FERM-BP-5748が付与されている。

#### 実施例4 ダイズ由来ラフィノース合成酵素をコードするDNAの取得

##### <1>ダイズ由来ラフィノース合成酵素遺伝子クローニングのためのプローブの検索

キュウリ由来ラフィノース合成酵素遺伝子全長をプローブとして用いて、ダイズ全RNAに対しノーザンハイブリダイゼーションを行った。プローブは、キュウリ由来ラフィノース合成酵素遺伝子を含むDNA断片を、実施例3で得られたプラスミドpMoss1oxCRSを制限酵素NotIで消化し、アガロースゲル電気泳動に付し、挿入断片を単離し、単離したDNA断片を $\alpha$ -P<sup>32</sup>dCTPにてラベルすることによって得た。全RNAとしてはダイズ未熟種子(開花後5～6週間)よりSDS-フェノール法にて調製した全RNA 30 μgを用いた。

30分間のプレハイブリダイゼーションの後、プローブを加えて42°C、一晩、ハイブリダイゼーションを行った。1×SSC、0.1%SDS、60°Cの条件で洗浄した。コントロールのキュウリ由来ラフィノース合成酵素のシグナルは認められたが、ダイズ由来RNAに対してははっきりしたシグナルが得られなかつた。キュウリ全長をプローブにするよりも、より保存された領域をプローブにすることが望ましいと判断した。

#### <2>シロイヌナズナのラフィノース合成酵素遺伝子の部分断片の単離

シロイヌナズナの開花後17～20日の莢125mgを液体窒素中で乳鉢を用いて磨碎した。この磨碎物に3mlの2×CTAB(2%セチルトリメチルアンモニウムプロマイド、0.1Mトリス塩酸緩衝液(pH9.5)、1.4MNaCl、0.5%メルカプトエタノール)を加え拡散させ、65°Cで10分間振盪した。これをファルコンチューブのブルーマックス(50ml)に移し、3mlのクロロホルム：イソアミルアルコール(24:1(v/v))を加え穏やかに混和し、12000rpmで10分間遠心した。上清を3mlのクロロホルム：イソアミルアルコール(24:1(v/v))にて再度抽出し、10000rpmで25分間遠心した。遠心上清1.8mlに対し、1.5mlのイソアミルアルコールを加え混和し、12000rpmで15分間、4°Cにて遠心し沈殿を得た。沈殿を70%エタノールで洗浄し沈殿を乾燥し、1mlのTE緩衝液に溶解した。4分の1量の10M塩化リチウム溶液を加えて混和し水中で4時間静置し12000rpmで15分間、4°Cにて遠心した。沈殿を2M塩化リチウム、70%エタノールにて洗浄し、乾燥後、100μlのTE緩衝液に溶解した。フェノール：クロロホルム(1:1(v/v))を加え攪拌し、12000rpmで15分間、4°Cにて遠心し、水層を得た。この水層をエタノール沈殿に付し、沈殿を70%エタノールで洗浄後、乾燥し、10μlのジエチルピロカーボネート処理水に溶解し全RNAとした。得られた全RNAは18.7μgであった。この全RNAから逆転写酵素SuperScript II(GIBCO BRL社製)を用いて一本鎖cDNAを合成した。

このcDNA混合物からラフィノース合成酵素遺伝子部分断片をPCRにより

増幅させるためにプライマーを合成した。プライマーは、キュウリ由来ラフィノース合成酵素遺伝子と相同性を有するDNAをジーンバンクより検索し、保存されている領域より一本鎖オリゴヌクレオチド（配列番号25、26）として合成した。先の一本鎖cDNAを鋳型にして、このプライマーによりPCRを行ったところ、約250塩基対のDNA断片が増幅された。この断片をTAクローニングキット（INVITROGEN BV社製）を用いてプラスミドpCR2.1にクローニングし塩基配列を解析したところ、配列番号27に示す塩基配列が得られた。キュウリ由来ラフィノース合成酵素と相同性を有するシロイヌナズナ由来ラフィノース合成酵素cDNA部分断片が得られたと認められた。

#### <3>ダイズ由来ラフィノース合成酵素cDNAのクローニング

ダイズの開花後5～6週間の種子4.5gを液体窒素中で乳鉢にて磨碎した。磨碎物より、SDS-フェノール法にて1.3mgの全RNAを抽出した。抽出物をオリゴdTセルロースカラム（poly(A)<sup>+</sup>RNA精製キット：STRATAGENE CLONING SYSTEMS社製）に供し、約6μgのpoly(A)<sup>+</sup>RNAを単離した。このうち約2μgのpoly(A)<sup>+</sup>RNAからTimeSaver cDNA合成キット（Pharmacia biotech社製）にて、オリゴdTプライマーにより二本鎖cDNAを合成した。得られたcDNAをλファージベクターλMOSS1ox（Amersham社製）のEcoRI制限酵素切断部位に組み込んだ後、Giga pack III Goldパッケージングキット（STRATAGENE CLONING SYSTEMS社製）を用いてファージ粒子中に取り込ませダイズのcDNAライブラリーを調製した。なお、本ライブラリーのタイマーは1.42×10<sup>7</sup>pfu/μgベクタ-cDNAであった。

ダイズcDNAライブラリーから1.5×10<sup>5</sup>pfuに相当するファージを、キュウリcDNAライブラリーと同様に、ナイロンメンブレン（Hybond-N<sup>+</sup>；Amersham社製）に転写し固定した。1枚のプレートに対し、2枚のメンブレンを転写し2セットを用意した。得られたメンブレンに対し、<2>で得られたシロイヌナズナ由来ラフィノース合成酵素cDNA遺伝子部分断片を

用いてスクリーニングを行った。このDNA断片は、Gene Imagesラベリング検出システム(Amersham社製)を用いてフルオレセインラベルしプローブとした。ハイブリダイゼーション及び検出は、キュウリcDNAライブラリースクリーニングと同様に行った。ただし、メンブランの洗浄は、1セットを1×SSC、0.1%SDSで、1セットを0.1×SSC、0.1%SDSで60°Cにて行った。両条件下で陽性のクローンの候補株を15個得、候補株について上記と同様にスクリーニングをさらに1回繰り返し純化したクローン5株を取得した。

上記陽性クローンをE. coli BM25.8に感染させ、cDNAを含むプラスミドを切り出した。さらに、このプラスミドで、E. coli JM109を形質転換し、形質転換体よりプラスミドDNAを調製し塩基配列解析試料とした。塩基配列解析はキュウリ由来ラフィノース合成酵素遺伝子と同様に行った。5クローンのうちの一つであるpMOSS1oxSRSは、塩基配列解析より、ダイズ由来ラフィノース合成酵素遺伝子全長を含むことが確認された。

pMOSS1oxSRSの挿入断片は、配列番号23に示す2780塩基対よりなる配列を有しており、750アミノ酸からなるラフィノース合成酵素をコードしていた。他のクローンの挿入断片は、pMOSS1oxSRSのものより短くラフィノース合成酵素遺伝子の5'側を欠失していた。

上記のようにして得られたラフィノース合成酵素をコードするDNAを含むDNA断片を含むプラスミドpMOSS1oxSRSを保持するエシェリヒア・コリJM109の形質転換体AJ13379は、平成9年10月20日から、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(郵便番号305 日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号)にブタペスト条約に基づき国際寄託されており、受託番号FERM BP-6149が付与されている。

## 実施例5 ラフィノース合成酵素をコードするDNAを含むキメラ遺伝子及び形質転換植物

### <1>キメラ遺伝子を含むプラスミドの構築

アグロバクテリウムとしてL B A 4 4 0 4、バイナリーベクターとしてp B I 1 2 1 (CLONTECH社)を用いて、シロイヌナズナにラフィノース合成酵素のDNA断片を導入した。p B I 1 2 1は、p B I N 1 9由来のプラスミドであり、ノパリン合成酵素遺伝子プロモーター、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ構造遺伝子(N P T II)、ノパリン合成酵素遺伝子ターミネーター(N o s - t e r)、CaMV 35Sプロモーター、G U S ( $\beta$ -グルクロニダーゼ)遺伝子、及びN o s - t e rが接続し、これらの両側に植物への移行が可能な配列を有する。CaMV 35Sプロモーターの下流にはS m a I部位があり、この部位に挿入されたインサートは該プロモーターの制御下で発現する。

バイナリーベクターp B I 1 2 1に、実施例3で得られたキュウリ由来ラフィノース合成酵素遺伝子断片を挿入した。ラフィノース合成酵素遺伝子をD r a I消化し、配列表配列番号4において1 3 8 2番目から2 5 2 9番目までの塩基を含むDNA断片をアガロースゲル電気泳動により調製した。この断片をp B I 1 2 1のS m a Iサイトにライゲーションした。このライゲーション反応液を用いてエシェリヒア・コリH B 1 0 1を形質転換し、形質転換株から組換えプラスミドを調製した。得られた組換えプラスミドのうち、CaMV 35Sプロモーターにラフィノース合成酵素DNA断片が逆向きに接続したもの(アンチセンス)、正の向きに接続したもの(センス)ものを2種選択し、それぞれ、p B I c R S 1及びp B I c R S 9と命名した。

また、ラフィノース合成酵素を発現させるキメラ遺伝子を含むプラスミドを構築した。ラフィノース合成酵素遺伝子を含むp M O S S 1 o x C R SをN o t I消化し、ラフィノース合成酵素遺伝子断片をアガロースゲル電気泳動により調製した。このDNA断片のN o t I切断部位をd N T Pを用いたT a q ポリメラーゼ反応によってフィルインし、3'側にA塩基を突出させたC R S断片を得た。一方、p B I 1 2 1はS m a I消化し、アガロースゲル電気泳動にて直鎖状のD

NAを精製し、dTTPを用いてTaqポリメラーゼ反応により、3'側にT塩基を付加させたpBI121/SmaIを得た。精製した後、CRS断片をpBI121/SmaIにライゲーションした。このライゲーション反応液を用いてエメリヒア・コリHB101を形質転換した。得られた形質転換株よりプラスミドDNAを調製し、これを制限酵素EcoRI、BamHI、XhoIのそれぞれ、及び、組み合わせによる消化を行った。得られた断片の分子量をアガロース電気泳動で測定し、物理的図を作成した。作成した物理的図から、組換えプラスミドのうち、CaMV 35Sプロモーターに対し、ラフィノース合成酵素遺伝子が正方向に接続したものを見出し、pBIsRS1と名付けた。

上記のようにして得られたプラスミドを、これらを含むエメリヒア・コリHB101とアグロバクテリウムLBA4404をトリペアレンタルメイティングすることによりアグロバクテリウムLBA4404に導入した。

#### <2>形質転換

シロイヌナズナの形質転換は以下のように行った。シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の種子は、吸水処理後、1%Tween20を含む80%エタノールにて5分間、同じく1%Tween20を含む10%次亜塩素酸ナトリウムで10分間処理し、滅菌水で5回洗浄して殺菌した。これを、1%低融点アガロースに懸濁し、MS培地 (MS基本培地(Murashige and Skoog, *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497 (1962))、B5ビタミン、10g/Lスクロース 0.5g/L MES、pH 5.8) にまいた。これを、22°C、16時間光照射、8時間暗期の培養室にて1週間培養し、双葉が展開したものをロックウールに定植した。同条件で培養を続け、約3週間後、植物が抽苔し、茎の高さが数cmになったところで摘心した。摘心後1週間し、伸長した側枝の最初の花が開花した状態まで生育させた。

ラフィノース合成酵素遺伝子を含む組換えプラスミドを導入したアグロバクテリウムの前培養を2mlのLB培地で行った。これを、50mg/Lカナマイシン、25mg/Lストレプトマイシン含有のLB培地に接種し28°Cで、約1日培養した。室温で集菌し、浸潤用懸濁培地 (1/2MS塩、1/2ガンボルグ

(Gamborg) B 5 ビタミン、5%スクロース、0.5 g/L MES、pH 5.7 (KOH)、使用直前にベンジルアミノプリンを最終濃度0.044 μM、またシルウェット(Silwet L 77)を1 L当たり200 μl (最終濃度0.02%)加える)に菌液のOD<sub>600</sub>が0.8になるように懸濁した。

浸潤を行う植物より開花結実している花を取り除いた。ロックウールを逆さにして、前記アグロバクテリウム懸濁液に結実していない花を漬け、デシケータに入れて、40 mM HGで15分間減圧した。2から4週間で、種子を集めた。収穫した種子は、デシケータで保存した。

つぎに、選抜培地にて、形質転換体を選抜した。先に述べたように種子を殺菌し、選抜培地(MS塩、ガンボルグB 5 ビタミン、1%スクロース、0.5 g/L MES、pH 5.8、0.8%寒天；オートクレーブ後、選択用抗生物質、カルベニシリン(最終濃度100 mg/L、カナマイシン(最終濃度50 mg/L)を加える)にて22°Cで培養し、耐性植物を選抜した。耐性植物は新しい培地に移し、本葉が展開するまで育てた。この植物から種子を収穫した。同様の選抜を繰り返し、T3種子を獲得した。T3種子について、先に述べた方法によりラフィノース含量を定量した。結果を3に示す。

表3

植物(プラスミド)	ラフィノース含量(mg/g)
野生株	0.20
形質転換体(pB1cRS1)	0.00
形質転換体(pB1cRS9)	0.00
形質転換体(pB1sRS1)	0.22

### 産業上の利用可能性

本発明により、精製されたラフィノース合成酵素、ラフィノース合成酵素遺伝子、ラフィノース合成酵素遺伝子と植物で発現可能な制御領域を有するキメラ遺

伝子、及びこのキメラ遺伝子が導入された植物が提供される。

本発明のラフィノース合成酵素を用いることにより、スクロース及びガラクチノールから効率よくラフィノースを合成することができる。また、本発明のラフィノース合成酵素遺伝子又はキメラ遺伝子を利用することにより、植物のラフィノース族オリゴ糖含量を変化させることができる。

## 配列表

## (1) 一般情報

(i) 出願人： 味の素株式会社

(ii) 発明の名称：ラフィノース合成酵素遺伝子、ラフィノースの製造法及び形質転換植物

(iii) 配列数： 30

(iv) 連絡先：

(A)宛名：味の素株式会社

(B)番地：京橋一丁目 15 番 1 号

(C)市：中央区

(D)州：東京都

(E)国：日本国

(F)ZIP：104

(v) コンピュータ読み取り可能形式

(A)媒体：フロッピーディスク

(B)コンピュータ：IBM PC 互換

(C)操作システム：PC-DOS/MS-DOS

(D)ソフトウェア：PatentIn

(vi) 現行出願データ

(A)出願番号：

(B)出願日：24. 10. 97

(C)分類：

(D)書類記号：B368AW20P628

(vii) 先の出願データ

(A)出願番号：JP 1997111124

(B)出願日：28. 04. 97

## (2) 配列番号 1 に関する情報

(i) 配列の性質

(A) 長さ：30

(B) 種類：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：ペプチド

(v) フラグメント型：中間部ペプチド

(xi) 配列：配列番号 1

Phe Gly Trp Cys Thr Trp Asp Ala Phe Tyr Leu Thr Val His Pro Gln

1

5

10

15

Gly Val Ile Glu Gly Val Arg His Leu Val Asp Gly Gly Cys

20

25

30

## (2) 配列番号2に関する情報

### (i) 配列の性質

(A) 長さ : 19  
 (B) 種類 : アミノ酸  
 (D) トポロジー : 直鎖状

### (ii) 配列の種類：ペプチド

(v) フラグメント型：中間部ペプチド  
(xi) 配列：配列番号 2

Pro Val Ser Val Gly Cys Phe Val Gly Phe Asp Ala Ser Glu Pro Asp  
1 5 10 15  
Ser Arg His

## (2) 配列番号3に関する情報

### (i) 配列の性質

(A) 長さ : 14  
 (B) 種類 : アミノ酸  
 (D) トポロジー : 直鎖状  
 (ii) 配列の種類 : ペプチド  
 (v) フラグメント型 : 中間部ペプチド  
 (xi) 配列 : 配列番号 3

Tyr Asp Gln Asp Gln Met Val Val Val Gln Val Pro Trp Pro  
1 5 10

## (2) 配列番号4に関する情報

### (i) 配列の性質

- (A) 長さ : 2569
- (B) 種類 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 二本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : cDNA to mRNA

(vi) 起源

- (A) 生物名 : キュウリ (*Cucumis sativus*)

(ix) 配列の特徴

- (A) 特徴を表す記号 : CDS
- (B) 存在位置 : 56..2407

(xi) 配列 : 配列番号 4

TTA AAT GAC ATG TCG TCA CCG TTT GCA ATC GAC GGA TCG GAT TTC ACT	154
Leu Asn Asp Met Ser Ser Pro Phe Ala Ile Asp Gly Ser Asp Phe Thr	
20 25 30	
GTG AAC GGT CAT TCG TTT CTG TCC GAT GTT CCT GAG AAC ATT GTT GCT	202
Val Asn Gly His Ser Phe Leu Ser Asp Val Pro Glu Asn Ile Val Ala	
35 40 45	
TCT CCT TCT CCG TAC ACT TCG ATA GAC AAG TCC CCG GTT TCG GTT GGT	250
Ser Pro Ser Pro Tyr Thr Ser Ile Asp Lys Ser Pro Val Ser Val Gly	
50 55 60 65	
TGC TTT GTT GGA TTC GAC GCG TCG GAA CCT GAT AGC CGA CAT GTT GTT	298
Cys Phe Val Gly Phe Asp Ala Ser Glu Pro Asp Ser Arg His Val Val	
70 75 80	
TCG ATT GGG AAG CTG AAG GAT ATT CGG TTT ATG AGT ATT TTC AGG TTT	346
Ser Ile Gly Lys Leu Lys Asp Ile Arg Phe Met Ser Ile Phe Arg Phe	
85 90 95	
AAG GTT TGG TGG ACT ACA CAC TGG GTT GGT CGA AAT GGT GGG GAT CTT	394
Lys Val Trp Trp Thr Thr His Trp Val Gly Arg Asn Gly Asp Leu	
100 105 110	
GAA TCG GAG ACT CAG ATT GTG ATC CTT GAG AAG TCA GAT TCT GGT CGA	442
Glu Ser Glu Thr Gln Ile Val Ile Leu Glu Lys Ser Asp Ser Gly Arg	
115 120 125	
CCG TAT GTT TTC CTT CTT CCG ATC GTT GAG GGA CCG TTC CGA ACC TCG	490
Pro Tyr Val Phe Leu Leu Pro Ile Val Glu Gly Pro Phe Arg Thr Ser	
130 135 140 145	
ATT CAG CCT GGG GAT GAT GAC TTT GTC GAT GTT TGT GTC GAG AGT GGT	538
Ile Gln Pro Gly Asp Asp Phe Val Asp Val Cys Val Glu Ser Gly	
150 155 160	
TCG TCG AAA GTT GTT GAT GCA TCG TTC CGA AGT ATG TTG TAT CTT CAT	586
Ser Ser Lys Val Val Asp Ala Ser Phe Arg Ser Met Leu Tyr Leu His	
165 170 175	
GCT GGT GAT GAT CCG TTT GCA CTT GTT AAA GAG GCG ATG AAG ATC GTG	634
Ala Gly Asp Asp Pro Phe Ala Leu Val Lys Glu Ala Met Lys Ile Val	
180 185 190	
AGG ACC CAT CTT GGA ACT TTT CGC TTG TTG GAG GAG AAG ACT CCA CCA	682
Arg Thr His Leu Gly Thr Phe Arg Leu Leu Glu Glu Lys Thr Pro Pro	
195 200 205	
GGT ATC GTG GAC AAA TTC GGT TGG TGC ACG TGG GAC GCG TTT TAC CTA	730
Gly Ile Val Asp Lys Phe Gly Trp Cys Thr Trp Asp Ala Phe Tyr Leu	
210 215 220 225	
ACG GTT CAT CCA CAG GGC GTA ATA GAA GGC GTG AGG CAT CTC GTC GAC	778
Thr Val His Pro Gln Gly Val Ile Glu Gly Val Arg His Leu Val Asp	
230 235 240	

GGC GGT TGT CCT CCC GGT TTA GTC CTA ATC GAC GAT GGT TGG CAA TCC	826
Gly Gly Cys Pro Pro Gly Leu Val Leu Ile Asp Asp Gly Trp Gln Ser	
245 250 255	
ATC GGA CAC GAT TCG GAT CCC ATC ACC AAA GAA GGA ATG AAC CAA ACC	874
Ile Gly His Asp Ser Asp Pro Ile Thr Lys Glu Gly Met Asn Gln Thr	
260 265 270	
GTC GCC GGC GAG CAA ATG CCC TGC CGT CTT TTG AAA TTC CAA GAG AAT	922
Val Ala Gly Glu Gln Met Pro Cys Arg Leu Leu Lys Phe Gln Glu Asn	
275 280 285	
TAC AAA TTC CGT GAC TAC GTC AAT CCC AAG GCC ACC GGC CCC CGA GCC	970
Tyr Lys Phe Arg Asp Tyr Val Asn Pro Lys Ala Thr Gly Pro Arg Ala	
290 295 300 305	
GGC CAG AAG GGG ATG AAG GCG TTT ATA GAT GAA CTC AAA GGA GAG TTT	1018
Gly Gln Lys Gly Met Lys Ala Phe Ile Asp Glu Leu Lys Gly Glu Phe	
310 315 320	
AAG ACT GTG GAG CAT GTT TAT GTT TGG CAT GCT TTG TGT GGA TAT TGG	1066
Lys Thr Val Glu His Val Tyr Val Trp His Ala Leu Cys Gly Tyr Trp	
325 330 335	
GGT GGC CTT CGC CCG CAG GTG CCT GGC TTG CCT GAG GCA CGT GTG ATT	1114
Gly Gly Leu Arg Pro Gln Val Pro Gly Leu Pro Glu Ala Arg Val Ile	
340 345 350	
CAG CCA GTG CTT TCA CCA GGG CTG CAG ATG ACG ATG GAG GAT TTG GCG	1162
Gln Pro Val Leu Ser Pro Gly Leu Gln Met Thr Met Glu Asp Leu Ala	
355 360 365	
GTG GAT AAG ATT GTT CTT CAT AAG GTC GGG CTG GTC CCG CCG GAG AAG	1210
Val Asp Lys Ile Val Leu His Lys Val Gly Leu Val Pro Pro Glu Lys	
370 375 380 385	
GCT GAG GAG ATG TAC GAA GGA CTT CAT GCT CAT TTG GAA AAA GTT GGG	1258
Ala Glu Glu Met Tyr Glu Gly Leu His Ala His Leu Glu Lys Val Gly	
390 395 400	
ATC GAC GGT GTT AAG ATT GAC GTT ATC CAC CTA TTG GAG ATG TTG TGT	1306
Ile Asp Gly Val Lys Ile Asp Val Ile His Leu Leu Glu Met Leu Cys	
405 410 415	
GAA GAC TAT GGA GGG AGA GTG GAT TTG GCA AAG GCA TAT TAC AAA GCA	1354
Glu Asp Tyr Gly Gly Arg Val Asp Leu Ala Lys Ala Tyr Tyr Lys Ala	
420 425 430	
ATG ACC AAA TCA ATA AAT AAA CAT TTT AAA GGA AAT GGA GTC ATT GCA	1402
Met Thr Lys Ser Ile Asn Lys His Phe Lys Gly Asn Gly Val Ile Ala	
435 440 445	
AGT ATG GAA CAT TGT AAC GAC TTC ATG TTC CTT GGC ACG GAA GCT ATC	1450
Ser Met Glu His Cys Asn Asp Phe Met Phe Leu Gly Thr Glu Ala Ile	
450 455 460 465	

TCT CTT GGT CGT GTT GGT GAT GAC TTT TGG TGC ACG GAC CCC TCT GGT	1498
Ser Leu Gly Arg Val Gly Asp Asp Phe Trp Cys Thr Asp Pro Ser Gly	
470 475 480	
GAT CCA AAC GGT ACG TTT TGG CTC CAA GGA TGT CAC ATG GTT CAT TGT	1546
Asp Pro Asn Gly Thr Phe Trp Leu Gln Gly Cys His Met Val His Cys	
485 490 495	
GCC AAC GAC AGC TTG TGG ATG GGG AAC TTC ATC CAC CCT GAC TGG GAT	1594
Ala Asn Asp Ser Leu Trp Met Gly Asn Phe Ile His Pro Asp Trp Asp	
500 505 510	
ATG TTC CAA TCC ACC CAC CCT TGT GCC GCC TTC CAT GCT GCC TCT CGA	1642
Met Phe Gln Ser Thr His Pro Cys Ala Ala Phe His Ala Ala Ser Arg	
515 520 525	
GCC ATC TCT GGT GGC CCG ATC TAT GTT AGT GAT TCT GTG GGA AAG CAT	1690
Ala Ile Ser Gly Gly Pro Ile Tyr Val Ser Asp Ser Val Gly Lys His	
530 535 540 545	
AAC TTT GAT CTT CTG AAA AAA CTA GTG CTT CCT GAT GGA TCG ATC CTT	1738
Asn Phe Asp Leu Leu Lys Lys Leu Val Leu Pro Asp Gly Ser Ile Leu	
550 555 560	
CGA AGT GAG TAC TAT GCA CTC CCG ACT CGC GAT TGT TTG TTT GAA GAC	1786
Arg Ser Glu Tyr Tyr Ala Leu Pro Thr Arg Asp Cys Leu Phe Glu Asp	
565 570 575	
CCT TTG CAT AAT GGA GAA ACT ATG CTT AAG ATT TGG AAT CTC AAC AAG	1834
Pro Leu His Asn Gly Glu Thr Met Leu Lys Ile Trp Asn Leu Asn Lys	
580 585 590	
TTC ACT GGA GTG ATT GGT GCA TTC AAC TGC CAA GGA GGA GGA TGG TGT	1882
Phe Thr Gly Val Ile Gly Ala Phe Asn Cys Gln Gly Gly Trp Cys	
595 600 605	
CGT GAG ACA CGC CGC AAC CAA TGC TTT TCA CAA TAC TCA AAA CGA GTG	1930
Arg Glu Thr Arg Arg Asn Gln Cys Phe Ser Gln Tyr Ser Lys Arg Val	
610 615 620 625	
ACA TCC AAA ACT AAC CCA AAA GAC ATA GAA TGG CAC AGT GGA GAA AAC	1978
Thr Ser Lys Thr Asn Pro Lys Asp Ile Glu Trp His Ser Gly Glu Asn	
630 635 640	
CCT ATC TCT ATT GAA GGC GTT AAA ACC TTT GCG CTT TAC CTC TAT CAA	2026
Pro Ile Ser Ile Glu Gly Val Lys Thr Phe Ala Leu Tyr Leu Tyr Gln	
645 650 655	
GCC AAA AAA CTT ATC CTC TCC AAG CCC TCT CAA GAT CTT GAC ATA GCT	2074
Ala Lys Lys Leu Ile Leu Ser Lys Pro Ser Gln Asp Leu Asp Ile Ala	
660 665 670	
CTT GAC CCA TTC GAA TTC GAG CTC ATC ACT GTT TCA CCA GTG ACC AAA	2122
Leu Asp Pro Phe Glu Phe Glu Leu Ile Thr Val Ser Pro Val Thr Lys	
675 680 685	

CTC ATC CAA ACT TCT CTA CAC TTT GCC CCA ATT GGG CTG GTG AAC ATG	2170
Leu Ile Gln Thr Ser Leu His Phe Ala Pro Ile Gly Leu Val Asn Met	
690 695 700 705	
CTT AAC ACT AGT GGA GCC ATC CAA TCT GTG GAC TAT GAC GAT GAC CTA	2218
Leu Asn Thr Ser Gly Ala Ile Gln Ser Val Asp Tyr Asp Asp Asp Leu	
710 715 720	
AGC TCA GTC GAG ATT GGT GTC AAA GGG TGT GGT GAG ATG CGA GTA TTT	2266
Ser Ser Val Glu Ile Gly Val Lys Gly Cys Gly Glu Met Arg Val Phe	
725 730 735	
GCA TCG AAA AAA CCA AGG GCT TGT CGT ATT GAT GGG GAG GAT GTT GGG	2314
Ala Ser Lys Lys Pro Arg Ala Cys Arg Ile Asp Gly Glu Asp Val Gly	
740 745 750	
TTC AAG TAT GAT CAG GAC CAA ATG GTG GTG GTT CAA GTG CCA TGG CCA	2362
Phe Lys Tyr Asp Gln Asp Gln Met Val Val Val Gln Val Pro Trp Pro	
755 760 765	
ATT GAT TCT TCA TCG GGT GGC ATT TCG GTT ATC GAG TAC TTG TTT	2407
Ile Asp Ser Ser Gly Gly Ile Ser Val Ile Glu Tyr Leu Phe	
770 775 780	
TAATTTTAT TTATGTARAG CTCAATGATT GTTGTGTTG TCGCTGTTGT TGCTATCAA	2467
GTATTTCTCT CCAAAAGAAA ATTATGTGTA ATTGGAGAG TAATTAAGTG AGTKAAATT	2527
TAAATAARAC TACTTTAAT TATTATCAA AAAAAAAA AA	2569

## (2) 配列番号 5 に関する情報

## (i) 配列の性質

(A) 長さ : 784

(B) 種類 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状

## (ii) 配列の種類 : タンパク質

## (xi) 配列 : 配列番号 5

Met Ala Pro Ser Phe Lys Asn Gly Gly Ser Asn Val Val Ser Phe Asp	
1 5 10 15	
Gly Leu Asn Asp Met Ser Ser Pro Phe Ala Ile Asp Gly Ser Asp Phe	
20 25 30	
Thr Val Asn Gly His Ser Phe Leu Ser Asp Val Pro Glu Asn Ile Val	
35 40 45	
Ala Ser Pro Ser Pro Tyr Thr Ser Ile Asp Lys Ser Pro Val Ser Val	
50 55 60	
Gly Cys Phe Val Gly Phe Asp Ala Ser Glu Pro Asp Ser Arg His Val	
65 70 75 80	
Val Ser Ile Gly Lys Leu Lys Asp Ile Arg Phe Met Ser Ile Phe Arg	
85 90 95	

Phe	Lys	Val	Trp	Trp	Thr	His	Trp	Val	Gly	Arg	Asn	Gly	Gly	Asp	
100							105					110			
Leu	Glu	Ser	Glu	Thr	Gln	Ile	Val	Ile	Leu	Glu	Lys	Ser	Asp	Ser	Gly
115						120						125			
Arg	Pro	Tyr	Val	Phe	Leu	Leu	Pro	Ile	Val	Glu	Gly	Pro	Phe	Arg	Thr
130							135					140			
Ser	Ile	Gln	Pro	Gly	Asp	Asp	Asp	Phe	Val	Asp	Val	Cys	Val	Glu	Ser
145					150					155				160	
Gly	Ser	Ser	Lys	Val	Val	Asp	Ala	Ser	Phe	Arg	Ser	Met	Leu	Tyr	Leu
					165					170				175	
His	Ala	Gly	Asp	Asp	Pro	Phe	Ala	Leu	Val	Lys	Glu	Ala	Met	Lys	Ile
					180					185				190	
Val	Arg	Thr	His	Leu	Gly	Thr	Phe	Arg	Leu	Leu	Glu	Lys	Thr	Pro	
					195					200				205	
Pro	Gly	Ile	Val	Asp	Lys	Phe	Gly	Trp	Cys	Thr	Trp	Asp	Ala	Phe	Tyr
					210					215				220	
Leu	Thr	Val	His	Pro	Gln	Gly	Val	Ile	Glu	Gly	Val	Arg	His	Leu	Val
					225					230				240	
Asp	Gly	Gly	Cys	Pro	Pro	Gly	Leu	Val	Leu	Ile	Asp	Asp	Gly	Trp	Gln
					245					250				255	
Ser	Ile	Gly	His	Asp	Ser	Asp	Pro	Ile	Thr	Lys	Glu	Gly	Met	Asn	Gln
					260					265				270	
Thr	Val	Ala	Gly	Glu	Gln	Met	Pro	Cys	Arg	Leu	Leu	Lys	Phe	Gln	Glu
					275					280				285	
Asn	Tyr	Lys	Phe	Arg	Asp	Tyr	Val	Asn	Pro	Lys	Ala	Thr	Gly	Pro	Arg
					290					295				300	
Ala	Gly	Gln	Lys	Gly	Met	Lys	Ala	Phe	Ile	Asp	Glu	Leu	Lys	Gly	Glu
					305					310				320	
Phe	Lys	Thr	Val	Glu	His	Val	Tyr	Val	Trp	His	Ala	Leu	Cys	Gly	Tyr
					325					330				335	
Trp	Gly	Gly	Leu	Arg	Pro	Gln	Val	Pro	Gly	Leu	Pro	Glu	Ala	Arg	Val
					340					345				350	
Ile	Gln	Pro	Val	Leu	Ser	Pro	Gly	Leu	Gln	Met	Thr	Met	Glu	Asp	Leu
					355					360				365	
Ala	Val	Asp	Lys	Ile	Val	Leu	His	Lys	Val	Gly	Leu	Val	Pro	Pro	Glu
					370					375				380	
Lys	Ala	Glu	Glu	Met	Tyr	Glu	Gly	Leu	His	Ala	His	Leu	Glu	Lys	Val
					385					390				395	
Gly	Ile	Asp	Gly	Val	Lys	Ile	Asp	Val	Ile	His	Leu	Leu	Glu	Met	Leu
					405					410				415	
Cys	Glu	Asp	Tyr	Gly	Gly	Arg	Val	Asp	Leu	Ala	Lys	Ala	Tyr	Tyr	Lys
					420					425				430	

- 55 -

Ala Met Thr Lys Ser Ile Asn Lys His Phe Lys Gly Asn Gly Val Ile  
 435 440 445  
 Ala Ser Met Glu His Cys Asn Asp Phe Met Phe Leu Gly Thr Glu Ala  
 450 455 460  
 Ile Ser Leu Gly Arg Val Gly Asp Asp Phe Trp Cys Thr Asp Pro Ser  
 465 470 475 480  
 Gly Asp Pro Asn Gly Thr Phe Trp Leu Gln Gly Cys His Met Val His  
 485 490 495  
 Cys Ala Asn Asp Ser Leu Trp Met Gly Asn Phe Ile His Pro Asp Trp  
 500 505 510  
 Asp Met Phe Gln Ser Thr His Pro Cys Ala Ala Phe His Ala Ala Ser  
 515 520 525  
 Arg Ala Ile Ser Gly Gly Pro Ile Tyr Val Ser Asp Ser Val Gly Lys  
 530 535 540  
 His Asn Phe Asp Leu Leu Lys Lys Leu Val Leu Pro Asp Gly Ser Ile  
 545 550 555 560  
 Leu Arg Ser Glu Tyr Tyr Ala Leu Pro Thr Arg Asp Cys Leu Phe Glu  
 565 570 575  
 Asp Pro Leu His Asn Gly Glu Thr Met Leu Lys Ile Trp Asn Leu Asn  
 580 585 590  
 Lys Phe Thr Gly Val Ile Gly Ala Phe Asn Cys Gln Gly Gly Trp  
 595 600 605  
 Cys Arg Glu Thr Arg Arg Asn Gln Cys Phe Ser Gln Tyr Ser Lys Arg  
 610 615 620  
 Val Thr Ser Lys Thr Asn Pro Lys Asp Ile Glu Trp His Ser Gly Glu  
 625 630 635 640  
 Asn Pro Ile Ser Ile Glu Gly Val Lys Thr Phe Ala Leu Tyr Leu Tyr  
 645 650 655  
 Gln Ala Lys Lys Leu Ile Leu Ser Lys Pro Ser Gln Asp Leu Asp Ile  
 660 665 670  
 Ala Leu Asp Pro Phe Glu Phe Glu Leu Ile Thr Val Ser Pro Val Thr  
 675 680 685  
 Lys Leu Ile Gln Thr Ser Leu His Phe Ala Pro Ile Gly Leu Val Asn  
 690 695 700  
 Met Leu Asn Thr Ser Gly Ala Ile Gln Ser Val Asp Tyr Asp Asp Asp  
 705 710 715 720  
 Leu Ser Ser Val Glu Ile Gly Val Lys Gly Cys Gly Glu Met Arg Val  
 725 730 735  
 Phe Ala Ser Lys Lys Pro Arg Ala Cys Arg Ile Asp Gly Glu Asp Val  
 740 745 750  
 Gly Phe Lys Tyr Asp Gln Asp Gln Met Val Val Val Gln Val Pro Trp  
 755 760 765

Pro Ile Asp Ser Ser Ser Gly Gly Ile Ser Val Ile Glu Tyr Leu Phe  
 770                            775                            780

## (2) 配列番号 6 に関する情報

## (i) 配列の性質

- (A) 長さ : 23
- (B) 種類 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

## (ii) 配列の種類 : 他の核酸

- (A) 説明 : 合成DNA

## (xi) 配列 : 配列番号 6

TTYTAYCTBA CHGTNCAYCC TCA                                    23

## (2) 配列番号 7 に関する情報

## (i) 配列の性質

- (A) 長さ : 23
- (B) 種類 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

## (ii) 配列の種類 : 他の核酸

- (A) 説明 : 合成DNA

## (xi) 配列 : 配列番号 7

TTYTAYCTBA CHGTNCAYCC CCA                                    23

## (2) 配列番号 8 に関する情報

## (i) 配列の性質

- (A) 長さ : 23
- (B) 種類 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

## (ii) 配列の種類 : 他の核酸

- (A) 説明 : 合成DNA

## (xi) 配列 : 配列番号 8

TTYTAYCTBA CHGTNCAYCC ACA                                    23

## (2) 配列番号 9 に関する情報

## (i) 配列の性質

- (A) 長さ : 23
- (B) 種類 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類：他の核酸

(A) 説明： 合成DNA

(xi) 配列：配列番号 9

TTYTAYCTBA CHGTNCAYCC GCA

23

(2) 配列番号 1 0 に関する情報

(i) 配列の性質

(A) 長さ：26

(B) 種類：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：他の核酸

(A) 説明： 合成DNA

(ix) 配列の特徴

(D) 他の情報： 6番目及び11番目のヌクレオチドNはイノシンを、他のNは、A、G、C又はTを表す。

(xi) 配列：配列番号 1 0

GARGGNGTNM GNCACTRGAT NGAYGG

26

(2) 配列番号 1 1 に関する情報

(i) 配列の性質

(A) 長さ：26

(B) 種類：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：他の核酸

(A) 説明： 合成DNA

(ix) 配列の特徴

(D) 他の情報： 6番目及び11番目のヌクレオチドNはイノシンを、他のNは、A、G、C又はTを表す。

(xi) 配列：配列番号 1 1

GARGGNGTNM GNCACTYGT NGAYGG

26

(2) 配列番号 1 2 に関する情報

(i) 配列の性質

(A) 長さ：26

(B) 種類：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：他の核酸

(A) 説明： 合成DNA

(ix) 配列の特徴

(D) 他の情報：6番目及び11番目のヌクレオチドNはイノシンを、他のNは、A、G、C又はTを表す。

(xi) 配列：配列番号1 2

GARGGNGTNM GNCA<sup>T</sup>TRGT NGAYGG

26

(2) 配列番号1 3に関する情報

(i) 配列の性質

- (A) 長さ：26
- (B) 種類：核酸
- (C) 鎖の数：一本鎖
- (D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：他の核酸

- (A) 説明：合成DNA

(ix) 配列の特徴

(D) 他の情報：3番目のヌクレオチドNはイノシンを、他のNは、A、G、C又はTを表す。

(xi) 配列：配列番号1 3

GTNGGNTGYT TYGTNGGYTT YGAYGC

26

(2) 配列番号1 4に関する情報

(i) 配列の性質

- (A) 長さ：26
- (B) 種類：核酸
- (C) 鎖の数：一本鎖
- (D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：他の核酸

- (A) 説明：合成DNA

(ix) 配列の特徴

(D) 他の情報：3番目のヌクレオチドNはイノシンを、他のNは、A、G、C又はTを表す。

(xi) 配列：配列番号1 4

GTNGGNTGYT TYGTNGGRTT YGAYGC

26

(2) 配列番号1 5に関する情報

(i) 配列の性質

- (A) 長さ：29
- (B) 種類：核酸
- (C) 鎖の数：一本鎖
- (D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：他の核酸

- (A) 説明：合成DNA

(ix) 配列の特徴

(D) 他の情報：9番目及び11番目のヌクレオチドNはイノシンを、他のNは、A、G、C又はTを表す。

(xi) 配列：配列番号15

TTYGAYGCNT CNGARCCHGA YTCDCGNCA

29

(2) 配列番号16に関する情報

(i) 配列の性質

- (A) 長さ：30
- (B) 種類：核酸
- (C) 鎖の数：一本鎖
- (D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：他の核酸

- (A) 説明：合成DNA

(ix) 配列の特徴

(D) 他の情報：9番目及び11番目のヌクレオチドNはイノシンを、他のNは、A、G、C又はTを表す。

(xi) 配列：配列番号16

TTYGAYGCNT CNGARCCHGA YTCDAGYCAY

30

(2) 配列番号17に関する情報

(i) 配列の性質

- (A) 長さ：20
- (B) 種類：核酸
- (C) 鎖の数：一本鎖
- (D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：他の核酸

- (A) 説明：合成DNA

(xi) 配列：配列番号17

GAYCARGAYC TRATGGTNGT

20

(2) 配列番号18に関する情報

(i) 配列の性質

- (A) 長さ：26
- (B) 種類：核酸
- (C) 鎖の数：一本鎖
- (D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：他の核酸

- (A) 説明：合成DNA

(ix) 配列の特徴

(D) 他の情報：6番目及び15番目のヌクレオチドNはイノシンを、他のNは、A、G、C又はTを表す。

(xi) 配列：配列番号18

CCRTCNACYA GRTGNCKNAC NCCYTC

26

## (2) 配列番号 1 9 に関する情報

## (i) 配列の性質

- (A) 長さ : 26
- (B) 種類 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

## (ii) 配列の種類 : 他の核酸

- (A) 説明 : 合成DNA

## (ix) 配列の特徴

(D) 他の情報 : 6番目及び15番目のヌクレオチドNはイノシンを、他のNは、A、G、C又はTを表す。

## (xi) 配列 : 配列番号 1 9

CCRTCNACRA GRTGNCKNAC NCCYTC

26

## (2) 配列番号 2 0 に関する情報

## (i) 配列の性質

- (A) 長さ : 26
- (B) 種類 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

## (ii) 配列の種類 : 他の核酸

- (A) 説明 : 合成DNA

## (ix) 配列の特徴

(D) 他の情報 : 6番目及び15番目のヌクレオチドNはイノシンを、他のNは、A、G、C又はTを表す。

## (xi) 配列 : 配列番号 2 0

CCRTCNACYA TRTGNCKNAC NCCYTC

26

## (2) 配列番号 2 1 に関する情報

## (i) 配列の性質

- (A) 長さ : 29
- (B) 種類 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

## (ii) 配列の種類 : 他の核酸

- (A) 説明 : 合成DNA

## (ix) 配列の特徴

(D) 他の情報 : 3番目及び18番目のヌクレオチドNはイノシンを、他のNは、A、G、C又はTを表す。

(xi) 配列 : 配列番号 2 1  
 TGNCGHGART CDGGYTCNGA NGCRTCAA 29

## (2) 配列番号 2 2 に関する情報

- (i) 配列の性質
  - (A) 長さ : 30
  - (B) 種類 : 核酸
  - (C) 鎖の数 : 一本鎖
  - (D) トポロジー : 直鎖状

- (ii) 配列の種類 : 他の核酸
  - (A) 説明 : 合成DNA

## (ix) 配列の特徴

(D) 他の情報 : 19番目のヌクレオチドNはイノシンを、他のNは、A、G、C又はTを表す。

(xi) 配列 : 配列番号 2 2  
 RTGRCTHGAR TCDGGYTCNG ANGCRTCAA 30

## (2) 配列番号 2 3 に関する情報

- (i) 配列の性質
  - (A) 長さ : 2780
  - (B) 種類 : 核酸
  - (C) 鎖の数 : 二本鎖
  - (D) トポロジー : 直鎖状
- (ii) 配列の種類 : cDNA to mRNA
- (vi) 起源
  - (A) 生物名 : ダイズ (Glycine max cv. Clark63)
- (ix) 配列の特徴
  - (A) 特徴を表す記号 : CDS
  - (B) 存在位置 : 156..2405

(xi) 配列 : 配列番号 2 3  
 TCTTCCATTG GAGGACCATT TCCTCCTGGA ATAGAAATAC TACCACACTT TTCTTTTTTC 60  
 ACTTCTCTAA GTTGCTAAGT TAATTGCTCC TTCATTTTT CACTCTCGT TCTCGCGTAC 120  
 CCGTGTACG GTAACTCGTG GTGAAGTGTT CGAAA ATG ACT GTC ACA CCT AAG 173

Met Thr Val Thr Pro Lys

1 5

ATC TCA GTT AAC GAT GGG AAA CTT GTT GTC CAT GGT AAG ACC ATT CTG 221  
 Ile Ser Val Asn Asp Gly Lys Leu Val Val His Gly Lys Thr Ile Leu  
 10 15 20

ACT GGA GTG CCA GAC AAC GTT GTG CTG ACT CCA GGT TCT GGA AGG GGT 269  
 Thr Gly Val Pro Asp Asn Val Val Leu Thr Pro Gly Ser Gly Arg Gly  
 25 30 35

CTT GTG ACT GGT GCT TTT GTT GGT GCC ACA GCT TCA CAC AGC AAA AGT	317
Leu Val Thr Gly Ala Phe Val Gly Ala Thr Ala Ser His Ser Lys Ser	
40 45 50	
CTC CAT GTG TTT CCA ATG GGT GTT TTA GAG GGG CTC CGG TTC ATG TGT	365
Leu His Val Phe Pro Met Gly Val Leu Glu Gly Leu Arg Phe Met Cys	
55 60 65 70	
TGT TTC CGG TTC AAG TTA TGG TGG ATG ACT CAG AGA ATG GGA ACT TGT	413
Cys Phe Arg Phe Lys Leu Trp Trp Met Thr Gln Arg Met Gly Thr Cys	
75 80 85	
GGG AGG GAT GTT CCT CTG GAG ACT CAA TTC ATG CTT ATT GAG AGC AAA	461
Gly Arg Asp Val Pro Leu Glu Thr Gln Phe Met Leu Ile Glu Ser Lys	
90 95 100	
GAG AGT GAA ACT GAT GGG GAG AAT TCT CCA ATC ATC TAC ACT GTC TTG	509
Glu Ser Glu Thr Asp Gly Glu Asn Ser Pro Ile Ile Tyr Thr Val Leu	
105 110 115	
CTT CCT CTC CTC GAA CAA TTC CGA GCT GTT CTT CAA GGC AAT GAC	557
Leu Pro Leu Leu Glu Gly Gln Phe Arg Ala Val Leu Gln Gly Asn Asp	
120 125 130	
AAG AAC GAG ATA GAG ATT TGC CTC GAG AGT GGG GAT AAT GCA GTT GAG	605
Lys Asn Glu Ile Glu Ile Cys Leu Glu Ser Gly Asp Asn Ala Val Glu	
135 140 145 150	
ACT GAC CAA GGC CTT CAC ATG GTT TAC ATG CAT GCT GGG ACC AAT CCC	653
Thr Asp Gln Gly Leu His Met Val Tyr Met His Ala Gly Thr Asn Pro	
155 160 165	
TTT GAA GTC ATC AAT CAA GCT GTC AAG GCT GTG GAA AAA CAC ATG CAA	701
Phe Glu Val Ile Asn Gln Ala Val Lys Ala Val Glu Lys His Met Gln	
170 175 180	
ACT TTT CTT CAT CGT GAG AAG AAA AGG TTG CCA TCT TGT CTT GAC TGG	749
Thr Phe Leu His Arg Glu Lys Lys Arg Leu Pro Ser Cys Leu Asp Trp	
185 190 195	
TTT GGA TGG TGC ACA TGG GAT GCT TTC TAT ACT GAT GTC ACA GCT GAG	797
Phe Gly Trp Cys Thr Trp Asp Ala Phe Tyr Thr Asp Val Thr Ala Glu	
200 205 210	
GGT GTT GAG GAA GGC CTG AAA AGT CTA TCA CAG GGA GGT ACA CCT CCA	845
Gly Val Glu Glu Gly Leu Lys Ser Leu Ser Gln Gly Gly Thr Pro Pro	
215 220 225 230	
CGA TTC CTC ATC ATA GAT GAT GGT TGG CAA CAG ATT GAA AAT AAA GCA	893
Arg Phe Leu Ile Ile Asp Asp Gly Trp Gln Gln Ile Glu Asn Lys Ala	
235 240 245	
AAG GAT GCT ACT GAA TGT TTG GTA CAA GAA GGA GCA CAG TTT GCT ACT	941
Lys Asp Ala Thr Glu Cys Leu Val Gln Glu Gly Ala Gln Phe Ala Thr	
250 255 260	

AGG TTG ACT GGT ATT AAA GAG AAT ACT AAA TTT CAA AAG AAA TTA CAG	989
Arg Leu Thr Gly Ile Lys Glu Asn Thr Lys Phe Gln Lys Lys Leu Gln	
265 270 275	
AAC AAT GAG CAG ATG TCA GGT CTG AAG CAT CTA GTA CAT GGA GCA AAG	1037
Asn Asn Glu Gln Met Ser Gly Leu Lys His Leu Val His Gly Ala Lys	
280 285 290	
CAG CAT CAC AAT GTG AAA AAT GTA TAT GTA TGG CAT GCA CTA GCT GGT	1085
Gln His His Asn Val Lys Asn Val Tyr Val Trp His Ala Leu Ala Gly	
295 300 305 310	
TAT TGG GGT GGA GTG AAG CCA GCA GCA ACC GGC ATG GAA CAT TAT GAC	1133
Tyr Trp Gly Val Lys Pro Ala Ala Thr Gly Met Glu His Tyr Asp	
315 320 325	
ACT GCC TTG GCA TAT CCA GTG CAG TCA CCA GGC GTG CTA GGA AAC CAA	1181
Thr Ala Leu Ala Tyr Pro Val Gln Ser Pro Gly Val Leu Gly Asn Gln	
330 335 340	
CCA GAC ATT GTC ATG GAC AGC TTG GCT GTA CAT GGC CTT GGC CTA GTG	1229
Pro Asp Ile Val Met Asp Ser Leu Ala Val His Gly Leu Gly Leu Val	
345 350 355	
CAC CCA AAG AAG GTT TTC AAT TTC TAC AAC GAG CTC CAT GCT TAC TTA	1277
His Pro Lys Lys Val Phe Asn Phe Tyr Asn Glu Leu His Ala Tyr Leu	
360 365 370	
GCT TCT TGT GGA GTA GAT GGA GTG AAG GTT GAT GTG CAG AAC ATT ATT	1325
Ala Ser Cys Gly Val Asp Gly Val Lys Val Asp Val Gln Asn Ile Ile	
375 380 385 390	
GAG ACC CTT GGT GCG GGA CAT GGT GGC CGA GTG TCA CTT ACT CGC AGC	1373
Glu Thr Leu Gly Ala Gly His Gly Gly Arg Val Ser Leu Thr Arg Ser	
395 400 405	
TAT CAT CAC GCG CTT GAG GCT TCC ATT GCT AGC AAT TTT ACT GAT AAC	1421
Tyr His His Ala Leu Glu Ala Ser Ile Ala Ser Asn Phe Thr Asp Asn	
410 415 420	
GGA TGC ATT GCG TGT ATG TGT CAC AAC ACT GAT GGA CTT TAT AGT GCT	1469
Gly Cys Ile Ala Cys Met Cys His Asn Thr Asp Gly Leu Tyr Ser Ala	
425 430 435	
AAG CAG ACT GCT ATT GTG AGA GCT TCT GAT GAT TTT TAC CCT CGT GAT	1517
Lys Gln Thr Ala Ile Val Arg Ala Ser Asp Asp Phe Tyr Pro Arg Asp	
440 445 450	
CCT GCT TCC CAT ACC ATC CAT ATT TCT TCT GTT GCA TAC AAC TCA CTA	1565
Pro Ala Ser His Thr Ile His Ile Ser Ser Val Ala Tyr Asn Ser Leu	
455 460 465 470	
TTC CTT GGA GAA TTC ATG CAA CCT GAC TGG GAC ATG TTT CAT AGT TTA	1613
Phe Leu Gly Glu Phe Met Gln Pro Asp Trp Asp Met Phe His Ser Leu	
475 480 485	

CAC CCA GCA GCA GAT TAT CAT GCT GCA GCT CGT GCA ATT GGT GGA TGT		1661	
His Pro Ala Ala Asp Tyr His Ala Ala Ala Arg Ala Ile Gly Gly Cys			
490	495	500	
CCT ATT TAT GTT AGT GAC AAG CCA GGC AAT CAC AAT TTT GAT CTT CTT		1709	
Pro Ile Tyr Val Ser Asp Lys Pro Gly Asn His Asn Phe Asp Leu Leu			
505	510	515	
AAG AAG CTG GTT CTC CCG GAT GGT TCG GTT CTC CGT GCT CAG TTA CCT		1757	
Lys Lys Leu Val Leu Pro Asp Gly Ser Val Leu Arg Ala Gln Leu Pro			
520	525	530	
GGC AGG CCA ACT CGT GAT TCT CTA TTT GTG GAT CCA GCC AGA GAT AGG		1805	
Gly Arg Pro Thr Arg Asp Ser Leu Phe Val Asp Pro Ala Arg Asp Arg			
535	540	545	550
ACT AGC TTG CTC AAA ATA TGG AAC CTG AAC AAA TGC TCT GGA GTT GTT		1853	
Thr Ser Leu Leu Lys Ile Trp Asn Leu Asn Lys Cys Ser Gly Val Val			
555	560	565	
GGT GTA TTT AAC TGC CAA GGT GCT GGA TGG TGC AAG ATA GAG AAG AAA		1901	
Gly Val Phe Asn Cys Gln Gly Ala Gly Trp Cys Lys Ile Glu Lys Lys			
570	575	580	
ACC CGC ATC CAT GAT ACA TCT CCT GGT ACA CTC ACC GCC TCT GTC TGC		1949	
Thr Arg Ile His Asp Thr Ser Pro Gly Thr Leu Thr Ala Ser Val Cys			
585	590	595	
GCC TCT GAT GTT GAC CTC ATC ACA CAA GTA GCA GGT GCT GAA TGG CTT		1997	
Ala Ser Asp Val Asp Leu Ile Thr Gln Val Ala Gly Ala Glu Trp Leu			
600	605	610	
GGA GAT ACA ATT GTT TAT GCT TAC AGA TCA GGT GAG GTG ATT CGG CTA		2045	
Gly Asp Thr Ile Val Tyr Ala Tyr Arg Ser Gly Glu Val Ile Arg Leu			
615	620	625	630
CCA AAA GGG GTT TCA ATT CCA GTG ACA CTA AAA GTT CTG GAG TTT GAG		2093	
Pro Lys Gly Val Ser Ile Pro Val Thr Leu Lys Val Leu Glu Phe Glu			
635	640	645	
CTT TTC CAC TTC TGT CCA ATC CAA GAA ATA GCT CCA AGT ATA TCA TTT		2141	
Leu Phe His Phe Cys Pro Ile Gln Glu Ile Ala Pro Ser Ile Ser Phe			
650	655	660	
GCA GCA ATA GGG CTA CTG GAT ATG TTC AAC ACT GGA GGA GCA GTG GAG		2189	
Ala Ala Ile Gly Leu Leu Asp Met Phe Asn Thr Gly Gly Ala Val Glu			
665	670	675	
CAG GTT GAG ATT CAT AAC CGA GCA GCA ACG AAA ACA ATA GCT CTT AGT		2237	
Gln Val Glu Ile His Asn Arg Ala Ala Thr Lys Thr Ile Ala Leu Ser			
680	685	690	
GTA AGG GGA AGA GGC AGA TTT GGA GTT TAC TCC TCC CAG AGA CCA CTG		2285	
Val Arg Gly Arg Gly Arg Phe Gly Val Tyr Ser Ser Gln Arg Pro Leu			
695	700	705	710

AAG TGT GTG GTA GGT GGC GCT GAA ACC GAC TTC AAC TAT GAC TCA GAG	2333
Lys Cys Val Val Gly Gly Ala Glu Thr Asp Phe Asn Tyr Asp Ser Glu	
715 720 725	
ACC GGG TTG ACA ACC TTC TCC ATT CCA GTT TCT CCA GAG GAG ATG TAC	2381
Thr Gly Leu Thr Thr Phe Ser Ile Pro Val Ser Pro Glu Glu Met Tyr	
730 735 740	
AGA TGG TCA ATA GAG ATC CAA GTT TGAGTCCTTT TTAAGACTTG GTGTTGATG	2435
Arg Trp Ser Ile Glu Ile Gln Val	
745 750	
CATTGTTGTA TCAGGAGAAG GGTTTGTG TAATTAAGCA TTGAGGGAAT TGTTGGAGTC	2495
AGGCAGAGAG AGAGGGGGGA GGTTTGTGTA AAGACACCTA GTATTAGTAT CATGTAGTGG	2555
AGAAAAAGGG TTGTTGATCC TAATAGCTAG ACAAGGCATG TTGTTAGTAGT CATGGGGTGG	2615
GGAAAGTCCTT TTGTTGTAGC ATGTAATTG GTTTAGACTT GTAGTATGTC ATCAATTAGA	2675
TGGATAAAGA GAGAATATTG TTATCTACCC GAGGATGTAA CAATGTTGTTGT TTCTCTGAAT	2735
AAAAAGTTCA CATCTGTCTT TTGGAATAAT AAAAAAAA AAAAAA	2780

## (2) 配列番号 24 に関する情報

## (i) 配列の性質

(A) 長さ : 750

(B) 種類 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状

## (ii) 配列の種類 : タンパク質

## (xi) 配列 : 配列番号 24

Met Thr Val Thr Pro Lys Ile Ser Val Asn Asp Gly Lys Leu Val Val	
1 5 10 15	
His Gly Lys Thr Ile Leu Thr Gly Val Pro Asp Asn Val Val Leu Thr	
20 25 30	
Pro Gly Ser Gly Arg Gly Leu Val Thr Gly Ala Phe Val Gly Ala Thr	
35 40 45	
Ala Ser His Ser Lys Ser Leu His Val Phe Pro Met Gly Val Leu Glu	
50 55 60	
Gly Leu Arg Phe Met Cys Cys Phe Arg Phe Lys Leu Trp Trp Met Thr	
65 70 75 80	
Gln Arg Met Gly Thr Cys Gly Arg Asp Val Pro Leu Glu Thr Gln Phe	
85 90 95	
Met Leu Ile Glu Ser Lys Glu Ser Glu Thr Asp Gly Glu Asn Ser Pro	
100 105 110	
Ile Ile Tyr Thr Val Leu Leu Pro Leu Leu Glu Gly Gln Phe Arg Ala	
115 120 125	
Val Leu Gln Gly Asn Asp Lys Asn Glu Ile Glu Ile Cys Leu Glu Ser	
130 135 140	

Gly Asp Asn Ala Val Glu Thr Asp Gln Gly Leu His Met Val Tyr Met  
 145 150 155 160  
 His Ala Gly Thr Asn Pro Phe Glu Val Ile Asn Gln Ala Val Lys Ala  
 165 170 175  
 Val Glu Lys His Met Gln Thr Phe Leu His Arg Glu Lys Lys Arg Leu  
 180 185 190  
 Pro Ser Cys Leu Asp Trp Phe Gly Trp Cys Thr Trp Asp Ala Phe Tyr  
 195 200 205  
 Thr Asp Val Thr Ala Glu Gly Val Glu Glu Gly Leu Lys Ser Leu Ser  
 210 215 220  
 Gln Gly Gly Thr Pro Pro Arg Phe Leu Ile Ile Asp Asp Gly Trp Gln  
 225 230 235 240  
 Gln Ile Glu Asn Lys Ala Lys Asp Ala Thr Glu Cys Leu Val Gln Glu  
 245 250 255  
 Gly Ala Gln Phe Ala Thr Arg Leu Thr Gly Ile Lys Glu Asn Thr Lys  
 260 265 270  
 Phe Gln Lys Lys Leu Gln Asn Asn Glu Gln Met Ser Gly Leu Lys His  
 275 280 285  
 Leu Val His Gly Ala Lys Gln His His Asn Val Lys Asn Val Tyr Val  
 290 295 300  
 Trp His Ala Leu Ala Gly Tyr Trp Gly Gly Val Lys Pro Ala Ala Thr  
 305 310 315 320  
 Gly Met Glu His Tyr Asp Thr Ala Leu Ala Tyr Pro Val Gln Ser Pro  
 325 330 335  
 Gly Val Leu Gly Asn Gln Pro Asp Ile Val Met Asp Ser Leu Ala Val  
 340 345 350  
 His Gly Leu Gly Leu Val His Pro Lys Lys Val Phe Asn Phe Tyr Asn  
 355 360 365  
 Glu Leu His Ala Tyr Leu Ala Ser Cys Gly Val Asp Gly Val Lys Val  
 370 375 380  
 Asp Val Gln Asn Ile Ile Glu Thr Leu Gly Ala Gly His Gly Gly Arg  
 385 390 395 400  
 Val Ser Leu Thr Arg Ser Tyr His His Ala Leu Glu Ala Ser Ile Ala  
 405 410 415  
 Ser Asn Phe Thr Asp Asn Gly Cys Ile Ala Cys Met Cys His Asn Thr  
 420 425 430  
 Asp Gly Leu Tyr Ser Ala Lys Gln Thr Ala Ile Val Arg Ala Ser Asp  
 435 440 445  
 Asp Phe Tyr Pro Arg Asp Pro Ala Ser His Thr Ile His Ile Ser Ser  
 450 455 460  
 Val Ala Tyr Asn Ser Leu Phe Leu Gly Glu Phe Met Gln Pro Asp Trp  
 465 470 475 480

## (2) 配列番号 2 5 に関する情報

### (i) 配列の性質

- (A) 長さ : 26
- (B) 種類 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

### (ii) 配列の種類：他の核酸

(A) 説明 : 合成DNA		
(xi) 配列 : 配列番号 2 5		
ATSCAVCCTG ACTGGGATAT GTTCCA		26
(2) 配列番号 2 6 に関する情報		
(i) 配列の性質		
(A) 長さ : 26		
(B) 種類 : 核酸		
(C) 鎖の数 : 一本鎖		
(D) トポロジー : 直鎖状		
(ii) 配列の種類 : 他の核酸		
(A) 説明 : 合成DNA		
(xi) 配列 : 配列番号 2 6		
CGAAGGAYYG AWCCATCAGG AARHAM		26
(2) 配列番号 2 7 に関する情報		
(i) 配列の性質		
(A) 長さ : 253		
(B) 種類 : 核酸		
(C) 鎖の数 : 二本鎖		
(D) トポロジー : 直鎖状		
(ii) 配列の種類 : cDNA to mRNA		
(vi) 起源		
(A) 生物名 : シロイヌナズナ (Arabidopsis thaliana)		
(xi) 配列 : 配列番号 2 7		
GGCTTATGCA ACCTGACTGG GAATGTTCCA TAGTCTACAC CCAACTGCAG AGTACCATGC	60	
TGCAGCGCGT GCAGTGGGTG GATGCGCAAT CTATGTCAGT GATAAGCCAG GCAACCACAA	120	
CTTTGATCTA TTGAGGAAGC TGGTTCTTCC TGATGGTTCA GTTCTTCGGG CTAAGCTCCC	180	
GGGTAGGCCT ACCCGTGACT GCTTATTGCG TGATCCAGCT AGAGATGGGA TCAGCTTGCT	240	
CAAGATCTGG AAC	253	
(2) 配列番号 2 8 に関する情報		
(i) 配列の性質		
(A) 長さ : 10		
(B) 種類 : アミノ酸		
(D) トポロジー : 直鎖状		
(ii) 配列の種類 : ペプチド		
(xi) 配列 : 配列番号 2 8		
Phe Gly Trp Cys Thr Trp Asp Ala Phe Tyr		
1	5	10

## (2) 配列番号 2 9 に関する情報

## (i) 配列の性質

- (A) 長さ : 13
- (B) 種類 : アミノ酸
- (D) トポロジー : 直鎖状

## (ii) 配列の種類 : ペプチド

## (ix) 配列の特徴

- (D) 他の情報 : 8番目のアミノ酸XaaはAla又はCysを表す。

## (xi) 配列 : 配列番号 2 9

Val	Tyr	Val	Trp	His	Ala	Leu	Xaa	Gly	Tyr	Trp	Gly	Gly
1					5					10		

## (2) 配列番号 3 0 に関する情報

## (i) 配列の性質

- (A) 長さ : 15
- (B) 種類 : アミノ酸
- (D) トポロジー : 直鎖状

## (ii) 配列の種類 : ペプチド

## (xi) 配列 : 配列番号 3 0

His	Asn	Phe	Asp	Leu	Leu	Lys	Lys	Leu	Val	Leu	Pro	Asp	Gly	Ser
1						5					10			15

## 請求の範囲

1. スクロースとガラクチノールからラフィノースを生成する活性を有するラフィノース合成酵素。

2. 下記 (A)、(B)、(C) 又は (D) に示すタンパク質であるラフィノース合成酵素。

(A) 配列表の配列番号 5 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列表の配列番号 5 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、スクロースとガラクチノールからラフィノースを生成する活性を有するタンパク質。

(C) 配列表の配列番号 24 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(D) 配列表の配列番号 24 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、スクロースとガラクチノールからラフィノースを生成する活性を有するタンパク質。

3. 下記性質を有する請求項 1 記載のラフィノース合成酵素。

(1) 作用及び基質特異性：スクロースとガラクチノールからラフィノースを生成する。

(2) 至適 pH：約 6 ~ 8

(3) 至適温度：約 35 ~ 40 °C

(4) 分子量：

①ゲルろ過クロマトグラフィーにより測定される分子量：約 75 kDa ~ 95 kDa

②ポリアクリルアミドゲル電気泳動により測定される分子量：約 90 kDa ~ 100 kDa

③還元条件下における SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により測定される分子量：約 90 kDa ~ 100 kDa

(5) 阻害：

ヨードアセトアミド、N-エチルマレイミド、ミオイノシトールにより阻害される。

4. アミノ酸配列中に、配列表の配列番号28～30に示す各アミノ酸配列を含む請求項1記載のラフィノース合成酵素。

5. 下記(C)又は(D)に示すタンパク質であるラフィノース合成酵素。

(C) 配列表の配列番号24に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(D) 配列表の配列番号24に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、スクロースとガラクチノールからラフィノースを生成する活性を有するタンパク質。

6. スクロース及びガラクチノールに請求項1～5のいずれか一項に記載のラフィノース合成酵素を作用させてラフィノースを生成させることを特徴とするラフィノースの製造方法。

7. 請求項1～5のいずれか一項に記載のラフィノース合成酵素をコードするDNA。

8. 下記(A)、(B)、(C)又は(D)に示すタンパク質をコードするDNA。

(A) 配列表の配列番号5に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列表の配列番号5に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、スクロースとガラクチノールからラフィノースを生成する活性を有するタンパク質。

(C) 配列表の配列番号24に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(D) 配列表の配列番号24に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、スクロースとガラクチノールからラフィノースを生成する活性を有するタンパク質。

9. 下記(C)又は(D)に示すタンパク質をコードするDNA。

(C) 配列表の配列番号 24 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(D) 配列表の配列番号 24 に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、スクロースとガラクチノールからラフィノースを生成する活性を有するタンパク質。

10. 下記 (a)、(b)、(c) 又は (d) に示すDNAである請求項8記載のDNA。

(a) 配列表の配列番号 4 に記載の塩基配列のうち、少なくとも塩基番号 56 ~ 2407 からなる塩基配列を含むDNA。

(b) 配列表の配列番号 4 に記載の塩基配列のうち、少なくとも塩基番号 56 ~ 2407 からなる塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつスクロースとガラクチノールからラフィノースを生成する活性を有するタンパク質をコードするDNA。

(c) 配列表の配列番号 23 に記載の塩基配列のうち、少なくとも塩基番号 156 ~ 2405 からなる塩基配列を含むDNA。

(d) 配列表の配列番号 23 に記載の塩基配列のうち、少なくとも塩基番号 156 ~ 2405 からなる塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつスクロースとガラクチノールからラフィノースを生成する活性を有するタンパク質をコードするDNA。

11. 下記 (c) 又は (d) に示すDNAである請求項9記載のDNA。

(c) 配列表の配列番号 23 に記載の塩基配列のうち、少なくとも塩基番号 156 ~ 2405 からなる塩基配列を含むDNA。

(d) 配列表の配列番号 23 に記載の塩基配列のうち、少なくとも塩基番号 156 ~ 2405 からなる塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつスクロースとガラクチノールからラフィノースを生成する活性を有するタンパク質をコードするDNA。

12. 下記 (e) 又は (f) に示すDNA。

(e) 配列表の配列番号 4 に記載の塩基配列のうち、少なくとも塩基番号 56 ~

2407からなる塩基配列若しくはその相補的塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA。

(f) 配列表の配列番号23に記載の塩基配列のうち、少なくとも塩基番号156～2405からなる塩基配列若しくはその相補的塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA。

13. ラフィノース合成酵素遺伝子又はその一部と、植物細胞で発現可能な転写制御領域とを含むキメラ遺伝子。

14. 前記ラフィノース合成酵素遺伝子が、請求項7～11のいずれか一項に記載のDNAである請求項12記載のキメラ遺伝子。

15. 前記転写制御領域が、前記DNAのコード鎖に相補的な配列を有するアンチセンスRNAを発現するように前記DNAに連結されている請求項13又は14記載のキメラ遺伝子。

16. 請求項13～15のいずれか一項に記載のキメラ遺伝子で形質転換された植物。

17. 請求項13～15のいずれか一項に記載のキメラ遺伝子で植物を形質転換し、この遺伝子を植物細胞内で発現させることにより、前記植物のラフィノース族オリゴ糖含量を変化させる方法。

1 / 7

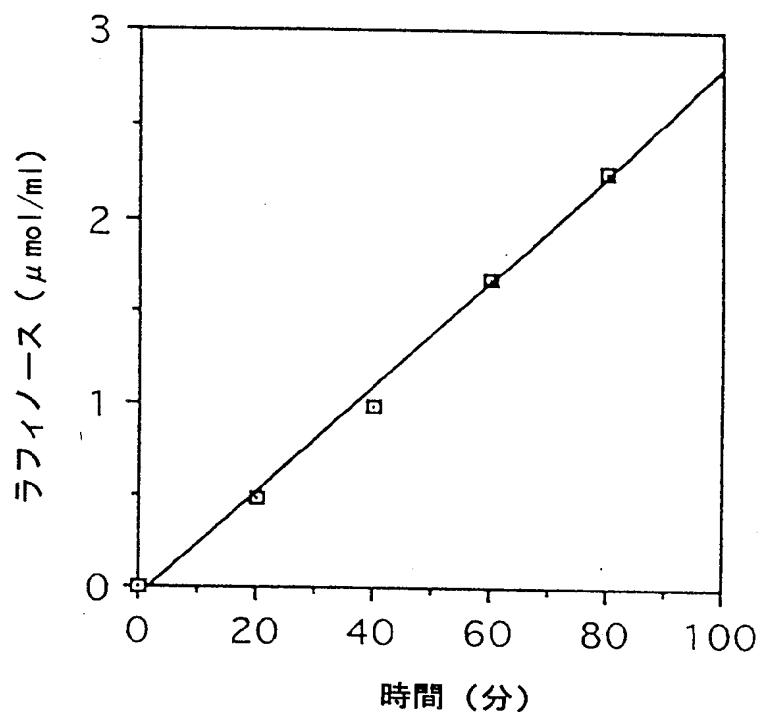


図 1

2 / 7

M S

200 —

116 ■

97.4 ■ —

66 —

45 —

図 2

3 / 7

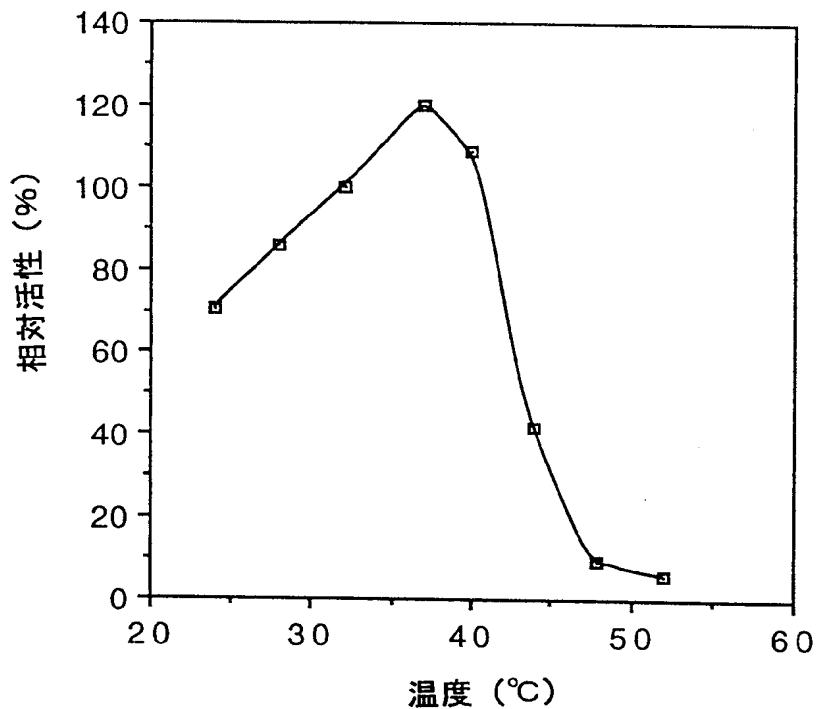


図 3

4 / 7

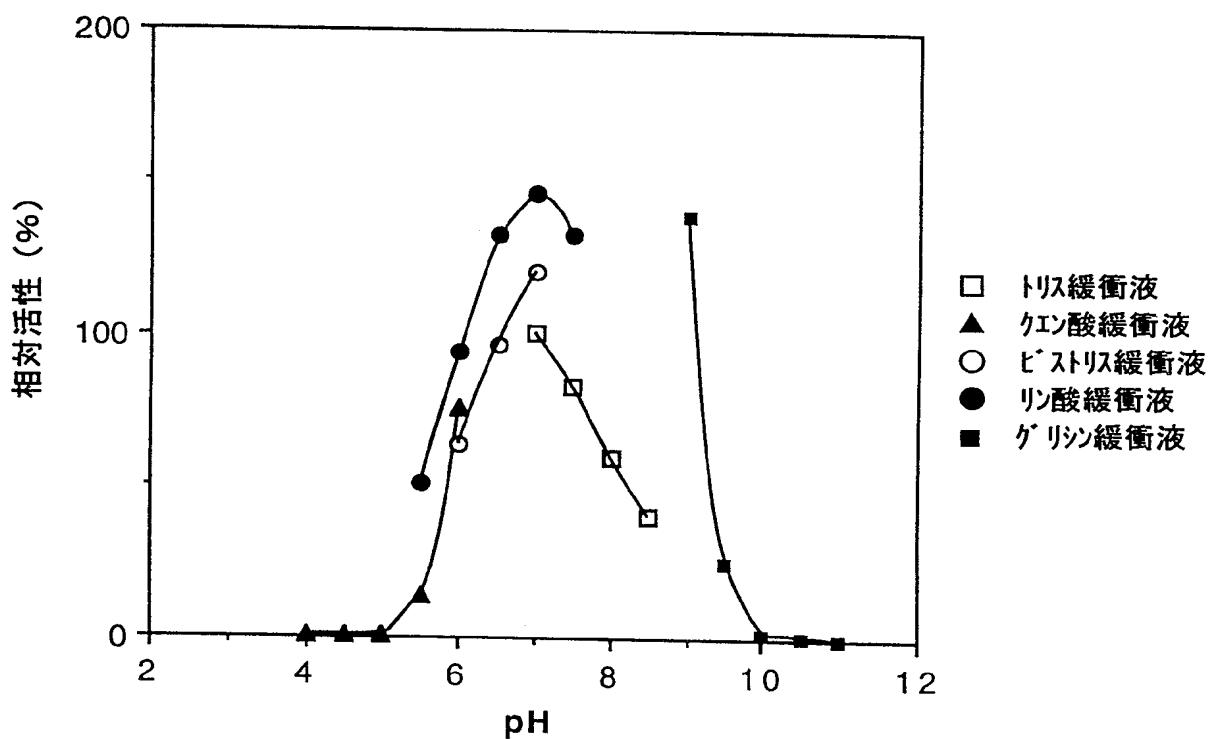


図 4

5 / 7

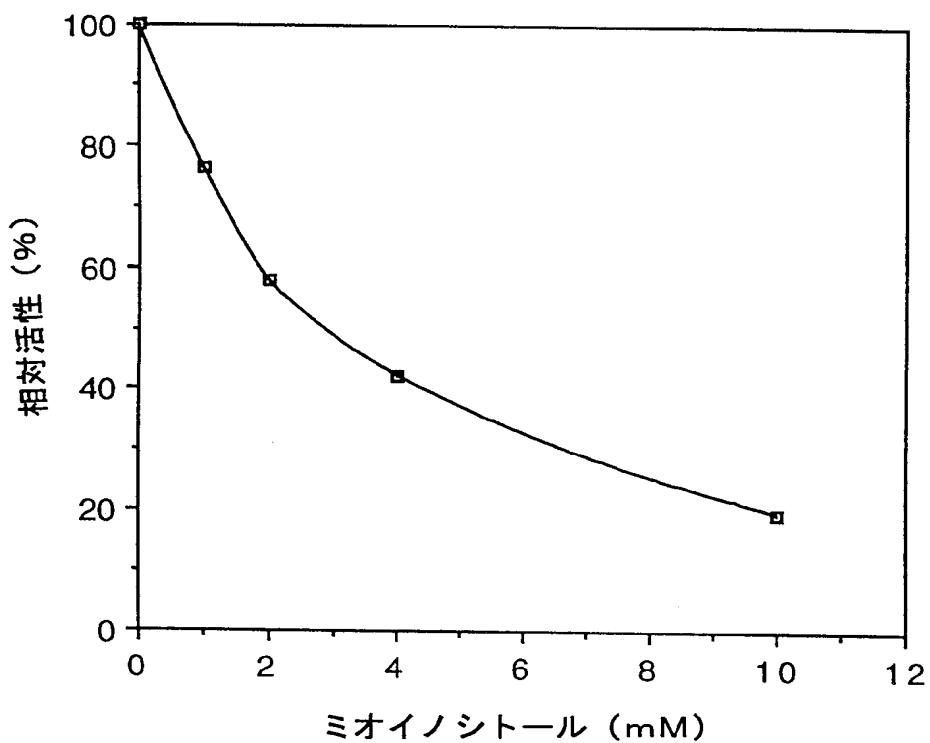


図 5

6 / 7

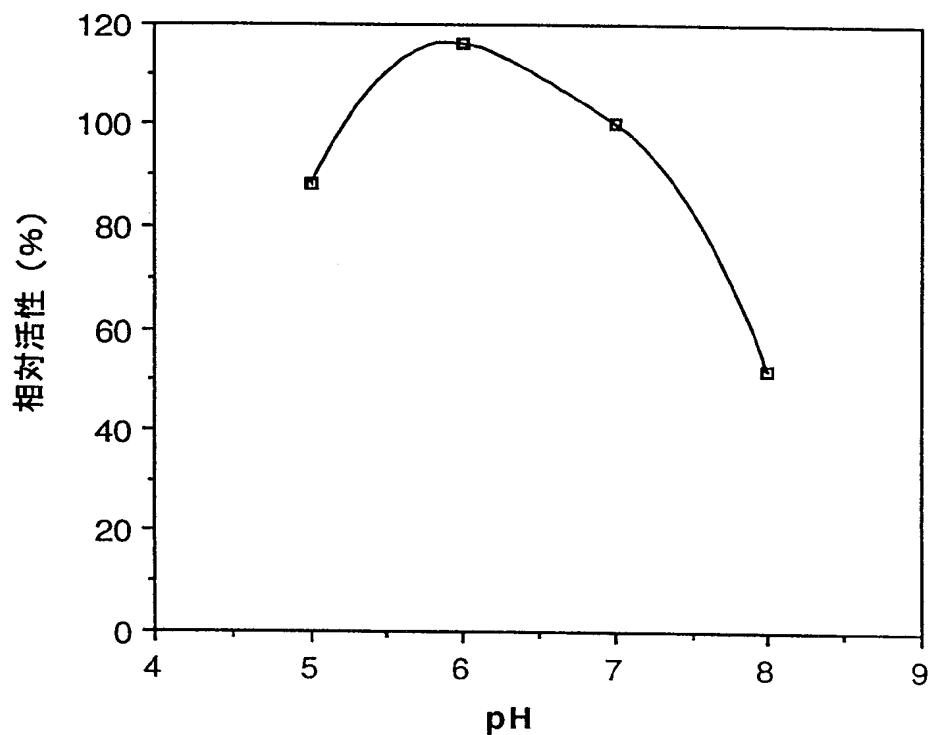


図 6

7 / 7

(配列番号6) A1 5' - TTY TAY CTB ACH GTN CAY CCT CA -3'  
 (配列番号7) A2 5' - TTY TAY CTB ACH GTN CAY CCC CA -3' B1 5' - GAR GGN GTN MGN CAY CTR GTN GAY GG -3' (配列番号10)  
 (配列番号8) A3 5' - TTY TAY CTB ACH GTN CAY CCA CA -3' B2 5' - GAR GGN GTN MGN CAY CTR GTN GAY GG -3' (配列番号11)  
 (配列番号9) A4 5' - TTY TAY CTB ACH GTN CAY CCG CA -3' B3 5' - GAR GGN GTN MGN CAY TTR GTN GAY GG -3' (配列番号12)  
 Phe Gly Trp Cys Thr Trp Asp Ala Phe Tyr Leu Thr Val His Pro Gln Gly Val Ile Glu Gly Val Arg His Leu Val Asp Gly Gly Cys  
 (配列番号1)  
 (配列番号18) 3' - CTY CCN CAN KCI GTR GAY CAI CTR CC -5' B' 1  
 (配列番号19) 3' - CTY CCN CAN KCI GTR GAR CAI CTR CC -5' B' 2  
 (配列番号20) 3' - CTY CCN CAN KCI GTR TAY CAI CTR CC -5' B' 3

D1 5' - TTY GAY GCN TCN GAR CCH GAY TCD CGN CA -3' (配列番号15)  
 D2 5' - TTY GAY GCN TCN GAR CCH GAY TCD AGY CAY -3' (配列番号16)  
 C1 5' - GTN GGN TGY TTY GTN GGY TTY GAY GC -3' (配列番号13)  
 C2 5' - GTN GGN TGY TTY GTN GGR TTY GAY GC -3' (配列番号14)  
 Pro Val Ser Val Gly Cys Phe Val Gly Phe Asp Ala Ser Glu Pro Asp Ser Arg His  
 (配列番号2)  
 3' - AAR CTR CGN AGI CTY GGD CTR AGH GCI GT -5' D' 1 (配列番号21)  
 3' - AAR CTR CGN AGI CTY GGD CTR AGH TCR GTR -5' D' 2 (配列番号22)

E 5' - GAY CAR GAY CTR ATG GTN GT -3' (配列番号17)  
 Tyr Asp Gln Asp Gln Met Val Val Gln Val Pro Trp Pro  
 (配列番号3)

図 7

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP97/03879

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

Int. C16 C12N9/10, C12N15/54, A01H5/00 // C12N5/10, C12N1/21, (C12N9/10, C12R1:91), (C12N5/10, C12R1:91), (C12N1/21, C12R1:01)  
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. C16 C12N9/10, C12N15/54, A01H5/00, C12N5/10, C12N1/21

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), GenBank/EMBL/DDBJ (GENETYX-CD)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Trendes in Glycoscience and Glycotechnology, Vol. 7, No. 34, (March 1995), Hshimoto H., et al.: "Synthesis of $\alpha$ -Galactosides with $\alpha$ -Galactosidase from Candida guilliermondii H-404", see pp. 149-158	1 - 8
A	WO, 93-2196, A (Du Pont de Nemours & Co., E.I.), February 4, 1993 (04. 02. 93) (Family: none)	1 - 17

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
January 21, 1998 (21. 01. 98)

Date of mailing of the international search report  
February 24, 1998 (24. 02. 98)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office  
Facsimile No.

Authorized officer  
Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>6</sup> C12N9/10, C12N15/54, A01H5/00 // C12N5/10, C12N1/21, (C12N9/10, C12R1:91), (C12N5/10, C12R1:91), (C12N1/21, C12R1:01)

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>6</sup> C12N9/10, C12N15/54, A01H5/00, C12N5/10, C12N1/21

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG), GenBank/EMBL/DDBJ(GENETYX-CD)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Trendes in Glycoscience and Glycotechnology, Vol. 7, No. 34, (March 1995), Hshmoto H., et al. : "Synthesis of $\alpha$ -Galactosides with $\alpha$ -Galactosidase from Candida guilliermondii H-404", see pp. 149-158	1-8
A	WO, 93-2196, A (DU PONT DE NEMOURS & CO E I), 4.2月. 1993 (04.02.93) (ファミリーなし)	1-17

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願目前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

21.01.98

国際調査報告の発送日

24.02.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

齊藤 真由美

印

4B

8931

電話番号 03-3581-1101 内線 3448